

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
6 novembre 2003 (06.11.2003)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 03/091304 A2

(51) Classification internationale des brevets⁷ : C08G

[FR/FR]; 11 allée Montcalm, F-31520 Ramonville (FR).
MEUNIER, Bernard [FR/FR]; 7 impasse des Meuniers,
F-31320 Castenet (FR).

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR03/01231

(74) Mandataires : **GOULARD, Sophie** etc.; CABINET
ORES, 36 rue de Saint Petersburg, F-75008 Paris (FR).

(22) Date de dépôt international : 17 avril 2003 (17.04.2003)

(25) Langue de dépôt : français

(81) États désignés (*national*) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ,
DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,
MZ, NI, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE,
SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,
VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
02/05049 23 avril 2002 (23.04.2002) FR

(71) Déposants (*pour tous les États désignés sauf US*) :
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE [FR/FR]; 3 rue Michel Ange, F-75016 Paris (FR). **INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE** [FR/FR]; 147 rue de l'Université, F-75007 Paris (FR).

(84) États désignés (*régional*) : brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (*pour US seulement*) : **TREVISIOL, Emmanuelle** [FR/FR]; 16 Vieux Chemin de Blagnac, F-31700 Comebarrieu (FR). **LECLAIRE, Julien** [FR/FR]; 15 rue Velane, F-31000 Toulouse (FR). **PRATVIEL, Geneviève** [FR/FR]; 8 chemin Savit, F-31100 Toulouse (FR). **CAMINADE, Anne-Marie** [FR/FR]; 17 rue de l'Estrel, F-31400 Toulouse (FR). **FRANCOIS, Jean** [FR/FR]; 3 place Albert Camus, F-31320 Castenet Tolosan (FR). **MAJORAL, Jean-Pierre**

Publiée :

— *sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès réception de ce rapport*

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

(54) Title: SOLID SUPPORTS FUNCTIONALISED BY PHOSPHORUS DENDRIMERS, METHOD FOR PREPARING SAME AND USES THEREOF

(54) Titre : SUPPORTS SOLIDES FONCTIONNALISÉS PAR DES DENDRIMÈRES PHOSPHORÉS, LEUR PROCÉDÉ DE PRÉPARATION ET APPLICATIONS

(57) Abstract: The invention concerns solid supports functionalised by phosphorus dendrimers, a method for preparing same and uses thereof for preparing biochips and the uses of said biochips, in particular for immobilizing molecules of interest, particularly biological molecules of interest such as nucleic acids, polypeptides, lipids and proteins.

(57) Abrégé : La présente invention est relative à des supports solides fonctionnalisés par des dendrimères phosphorés, à leur procédé de préparation, à leur utilisation pour la préparation de biopuces et aux applications de ces biopuces, en particulier pour l'immobilisation de molécules d'intérêt, notamment de molécules biologiques d'intérêt telles que des acides nucléiques, des polypeptides, des lipides et des protéines.

WO 03/091304 A2

SUPPORTS SOLIDES FONCTIONNALISÉS PAR DES DENDRIMÈRES PHOSPHORÉS, LEUR PROCÉDÉ DE PRÉPARATION ET APPLICATIONS

La présente Invention est relative à des supports solides fonctionnalisés par des dendrimères phosphorés, à leur procédé de préparation, à leur utilisation pour la préparation de biopuces et aux applications de ces biopuces, en particulier pour l'immobilisation de macromolécules, notamment de macromolécules biologiques telles que des acides nucléiques, des lipides, des protéines (peptides, enzymes, anticorps, ...) ou leurs partenaires moléculaires.

Le développement exponentiel de la génomique et de la pharmacogénomique lié au séquençage non seulement du génome humain, mais également à celui d'animaux, de bactéries, de virus, de plantes, etc... amène les laboratoires de recherche académiques ou industriels à consommer de manière massive des biopuces fiables, faciles à fabriquer.

Or, dans ce cadre particulier, il est primordial de pouvoir disposer de supports solides fonctionnalisés présentant un certain nombre de qualités.

Ces supports doivent en particulier permettre l'immobilisation reproductible de molécules d'intérêt, dans la mesure où une immobilisation reproductible est conditionnelle d'une détection elle-même reproductible.

Ces supports doivent également permettre l'immobilisation des molécules d'intérêt de façon sensible. La sensibilité d'un support solide fonctionnalisé dépend du taux d'immobilisation et de la méthode de détection d'un signal, mais aussi et surtout du niveau du bruit de fond (signal non spécifique). Une diminution du bruit de fond améliore le rapport signal/bruit. En effet, dans un dispositif dans lequel on détecte la présence d'espèces biologiques au voisinage de la surface, le bruit de fond vient essentiellement de l'adsorption non spécifique de molécules y compris de molécules biologiques d'intérêt marquées et qu'il convient par conséquent de limiter. L'idéal est donc d'obtenir un support qui possède un bruit de fond très bas et une intensité de détection du signal élevée.

D'autre part, et notamment dans le cas particulier des réactions d'hybridation mettant en œuvre des acides nucléiques, l'accrochage des sondes sur la surface d'un support solide doit garantir l'intégrité de la séquence et la stabilité du dépôt. Après l'étape d'hybridation les résultats doivent être reproductibles d'un support à l'autre. A cet effet, les sondes doivent être espacées de la surface du support solide afin de ne pas perturber l'hybridation avec les acides nucléiques cibles. Ceci permet de s'approcher des conditions d'hybridation en solution en mimant une hybridation en 3 dimensions plutôt qu'en 2 dimensions classiquement obtenues par la technique lame de verre. Un espaceur d'au moins une quarantaine d'atomes (4-5 nm) est nécessaire pour éviter les contraintes stériques entre l'ADN et la surface du support.

Par ailleurs, il est important de pouvoir disposer de supports solides fonctionnalisés réutilisables. La possibilité de pouvoir disposer d'un support réutilisable est d'un grand intérêt car elle autorise l'analyse de plusieurs échantillons biologiques avec un seul et même dispositif, ce qui permet d'effectuer des comparaisons quantitatives. De plus, les supports réutilisables autorisent la réalisation de plusieurs mesures sur un même échantillon et permettent ainsi l'amélioration des résultats d'un point de vue statistique.

A l'heure actuelle, différents types de procédés de préparation des biopuces ont déjà été proposés.

Les biopuces, et en particulier les biopuces à acides nucléiques, peuvent être fabriquées soit par synthèse *in situ* soit par immobilisation de sondes.

Dans le premier cas (synthèse *in situ*), les sondes sont des oligonucléotides qui sont synthétisés étape par étape directement sur le support et qui ont une taille généralement comprise entre 20 et 30 bases. Ce procédé de fabrication permet d'avoir accès à des puces à haute densité (McGall *et al*, J. Am. Chem. Soc., 1997, 119, 5081-5090).

Dans le deuxième cas (immobilisation de sondes), les sondes sont présynthétisées puis immobilisées sur le support. Deux types d'interactions avec la surface peuvent alors entrer en jeu.

L'acide nucléique sonde peut être maintenu sur la surface par des interactions électrostatiques entre les groupements phosphates du squelette chargés négativement et la surface modifiée du support chargée positivement. A titre d'exemple, ce type de biopuce peut être obtenu par recouvrement de la surface avec de la poly-L-lysine ou par silanisation avec un amino-silane (Zammatteo *et al*, Anal. Biochem., 2000, **280**, 143-150 ; Eisen *et al*, Methods in Enzymol, 1999, **303**, 179-205). Dans ce type d'immobilisation, la sonde est généralement couchée sur le support ce qui peut entraîner des problèmes d'accessibilité lors de l'étape d'hybridation. De plus, ce mode d'interactions ioniques n'est pas suffisamment stable pour permettre une réutilisation de la biopuce.

L'acide nucléique sonde peut également être greffé sur le support par le biais d'interactions covalentes. Généralement les liaisons entre les sondes et le support sont établies par une des extrémités 3' ou 5' de l'acide nucléique permettant une accessibilité de la sonde sur toute sa longueur d'où une meilleure qualité de la réponse en terme d'hybridation. Plusieurs combinaisons de fonctionnalisation du support et des acides nucléiques peuvent être rencontrées. Le support peut, par exemple, comporter des fonctions nucléophiles telles que des fonctions -NH₂ ou -SH et l'acide nucléique à greffer comporte alors une fonction électrophile telle que par exemple une fonction -CHO, -NCS, -NHS ou encore -COOR, et inversement. Selon une autre variante, le support et l'acide nucléique peuvent être nucléophiles et un espaceur di-électrophile permettra le couplage entre les deux entités. Enfin le support et la sonde peuvent être électrophiles et le couplage sera réalisé grâce à un espaceur di-nucléophile.

Les biopuces fabriquées actuellement sont, pour une très grande majorité, réalisées en utilisant le verre comme support.

Les plus utilisées possèdent des surfaces fonctionnalisées avec un espaceur terminé par une fonction -NH₂. Leur efficacité en terme d'accrochage et d'hybridation a été confirmée mais aucune réutilisation de ce type de lame n'est possible, les interactions entre les sondes et le support étant de type ionique.

D'autres lames comportant à leur surface des fonctions aldéhyde sont commercialisées. Ces fonctions sont introduites par utilisation d'un silane-aldéhyde, espaceur simple, qui ne présente qu'une seule fonction d'ancrage par molécule que ce soit du côté du support ou du côté des acides nucléiques. Or il a été
5 montré que l'ancrage par plusieurs points sur la surface est important (Zhao *et al.*, Nucl. Acids Res., 2001, 29, 955-959 ; demande internationale WO 01/51689) puisqu'il permet d'assurer une augmentation des sites de fixation des sondes sur le support ce qui entraîne une meilleure réponse en terme d'hybridation.

Une autre façon d'obtenir une meilleure sensibilité de détection est
10 notamment reportée dans les travaux de M. Beier et J.D. Hoheisel, Nucl. Acids Res., 1999, 27, 1970-1977. Les auteurs ont construit, sur une lame de verre, des molécules ramifiées à six branches dans le but d'augmenter la densité de sondes. La nature de ces espaceurs ramifiés permet aussi de moduler la nature hydrophile ou hydrophobe de la surface. Leur procédé de préparation inclut au total huit étapes de synthèse, à partir
15 d'une lame aminée, pour obtenir la biopuce ce qui limite fortement leur développement industriel. De plus, les molécules ramifiées sont générées *in situ* de façon non contrôlable, et leur structure n'est pas définie, ce qui ne permet pas de garantir une homogénéité de la surface de la biopuce ainsi obtenue. Tous les liens étant covalents, les auteurs ont montré, que leurs biopuces pouvaient être réutilisées. Il
20 est à noter que la réutilisation des biopuces est courante dans le cas d'un support en Nylon® et a été plus récemment décrite avec du plastique (voir demande internationale WO 00/55627).

Enfin, des travaux récents (Benters *et al.*, Chembiochem., 2001, 2, 686-694) décrivent l'utilisation de dendrimères aminés "PAMAM® starbust" pour la
25 fabrication de biopuces, en sept étapes de synthèse exigeantes en terme de conditions opératoires, et dont certaines ne peuvent être contrôlées puisqu'elles sont réalisées directement sur le verre, pour l'obtention d'un support qui n'est pas stable dans le temps. En effet, l'utilisation de ces biopuces inclut une étape d'activation préalable de la couche de dendrimères avant de réaliser le couplage avec les oligonucléotides.
30 Cette étape génère une surface réactive qui n'est pas stable dans le temps puisque les auteurs indiquent que les sondes doivent être greffées immédiatement après l'activation. Ceci limite fortement la commercialisation de ce type de support.

Le développement exponentiel de la génomique et de la pharmacogénomique lié au séquençage non seulement du génome humain, mais également à celui d'animaux, de bactéries, de virus, de plantes, etc... amène les laboratoires de recherche académiques ou industriels à consommer de manière massive des biopuces fiables, faciles à fabriquer. La réutilisation est un critère supplémentaire qui permet de valider de manière statistique les essais biologiques. C'est donc afin de remédier à l'ensemble de ces inconvénients et de pourvoir à des biopuces réutilisables pouvant être fabriquées à moindre coût, en peu d'étapes, de manière contrôlée et reproductible et présentant une excellente stabilité et une très bonne sensibilité de détection, que les Inventeurs ont mis au point ce qui fait l'objet de l'Invention.

La présente Invention a donc pour premier objet un support solide caractérisé par le fait qu'il comprend au moins une surface fonctionnalisée de façon covalente par des dendrimères phosphorés possédant un noyau central qui contient au moins deux groupements fonctionnels et comportant à leur périphérie plusieurs fonctions aptes à permettre la fixation desdits dendrimères sur ladite surface ainsi que la fixation ou la synthèse *in situ* de molécules d'intérêt, lesdits dendrimères ayant une taille comprise entre 1 et 20 nm.

Dans la suite de la description, de tels supports solides fonctionnalisés par des dendrimères phosphorés sont appelés « dendrilames ».

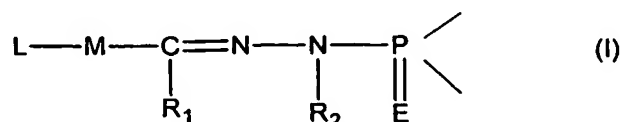
Les dendrimères sont des polymères, isomoléculaires à structure ramifiée et définie, formés d'un noyau central (cœur) à partir duquel sont créées ou greffées des ramifications. Ces ramifications sont multifonctionnelles, c'est-à-dire qu'elles portent, en particulier en périphérie, plusieurs groupements chimiques fonctionnels, identiques ou différents, choisis selon les propriétés que l'on souhaite conférer au dendrimère. Chaque nouvelle génération est obtenue par introduction d'un nouveau niveau de ramifications. L'ensemble des points de jonctions des branches situés à une égale distance du cœur correspond à une génération. Une représentation schématique d'un dendrimère de génération 4, obtenu à partir d'un cœur trifonctionnel, est donnée sur la figure 1 annexée.

Parmi les dendrimères pouvant être utilisés selon l'Invention, on préfère ceux qui sont constitués :

- d'une couche centrale sous la forme d'un noyau central P_0 , éventuellement phosphoré, comprenant de 2 à 12 groupements fonctionnalisés,

- de n couches intermédiaires, identiques ou différentes, chacune desdites couches intermédiaires étant constituée d'unités P_1 répondant à la formule (I)

5 suivante :



dans laquelle :

L est un atome d'oxygène, de phosphore, de soufre ou d'azote,

M représente l'un des groupes suivants :

- 10
- un groupe aromatique di-, tri- ou tétrasubstitué par des groupes alkyles, des groupes alcoxy, des groupements insaturés du type oléfinique en C_1 - C_{12} , azoïque, acétylénique, tous ces groupes pouvant incorporer ou non des atomes de phosphore, d'oxygène, d'azote, de soufre ou des halogènes, ou
 - 15 • un groupe alkyle ou alcoxy comportant plusieurs substituants tels que définis lorsque **M** est un groupe aromatique,

R₁ et **R**₂, qui peuvent être identiques ou différents, représentent un atome d'hydrogène ou l'un des groupes suivants : alkyle, alcoxy, aryle, comportant ou non des atomes de phosphore, d'oxygène, de soufre, d'azote ou des halogènes avec **R**₂ étant le plus souvent différent de **R**₁,

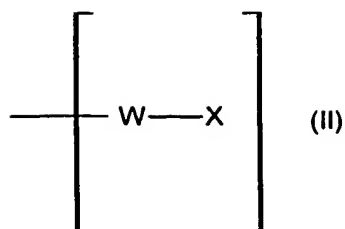
20

n est un nombre entier compris entre 1 et 11,

E est un atome d'oxygène, de soufre ou d'azote, ledit atome d'azote pouvant être lié à un groupe alkyle, alcoxy ou aryle, tous ces groupes pouvant incorporer ou non des atomes de phosphore, d'oxygène, d'azote, de soufre ou des halogènes,

25

- une couche externe constituée d'unités P_2 , identiques ou différentes, et répondant à la formule II suivante :

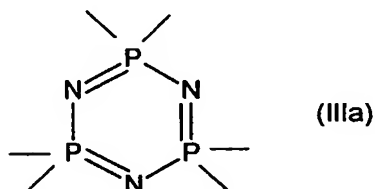


dans laquelle :

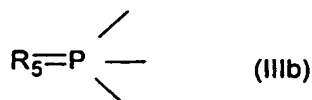
W représente l'un des groupes suivants : alkyle, alcoxy, aryle, tous ces groupes comportant ou non des atomes de phosphore, d'oxygène, d'azote, de soufre ou des halogènes,

X représente un groupement aldéhyde, thiol, amine, époxyde, acide carboxylique, alcool, phénol, et de manière plus générale tout groupement comportant ou non des atomes de phosphore, d'oxygène, d'azote, de soufre, de carbone ou d'halogène.

De façon préférentielle, le noyau central P₀ de ces dendrimères est sélectionné dans le groupe constitué par le groupement de formule générale IIIa :



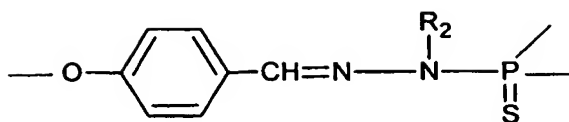
et le groupement de formule générale IIIb :



dans lequel R₅ représente un atome de soufre, d'oxygène ou d'azote.

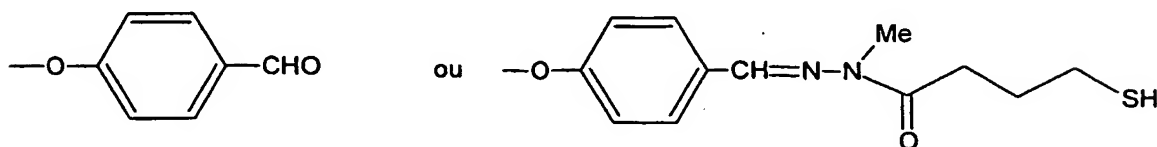
Selon une forme de réalisation avantageuse de l'Invention, les dendrimères sont choisis parmi les composés dans lesquels le groupe de formule (I) ci-dessus représente le groupe suivant :

8



dans lequel R_2 représente un radical alkyle en C_1 - C_{12} et plus particulièrement un radical méthyle ;

et le groupe de formule (II) représente l'un des deux groupes suivants :



5

et dans lesquels le nombre de générations varie de préférence entre 1 et 6.

Des exemples de tels dendrimères sont donnés sur les figures 2 et 3 annexées qui représentent respectivement la structure d'un dendrimère de génération 4 à terminaisons aldéhyde et la structure d'un dendrimère de génération 3 à terminaisons thiol.

Parmi les supports solides pouvant être fonctionnalisés conformément à l'Invention, on peut en particulier citer les supports comportant au moins une surface siliciée telle que les lames, les billes et les capillaires en verre, les supports en silicium, en plastique et les supports métalliques tels que par exemple les plots d'or.

Les dendrimères utilisés conformément à l'Invention peuvent être synthétisés de façon connue de l'Homme du métier, par répétition d'une même séquence réactionnelle permettant l'obtention d'une nouvelle génération à la fin de chaque cycle de synthèse et par conséquent d'un nombre croissant de branches et de fonctions périphériques toutes identiques (Tomalia D.A., Ang. Chem. Int. Ed., 1990, 29, 138 ; Launay *et al*, Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 1994, 33, 1589 et J. Organomet. Chem., 1997, 529, 51).

En particulier, ces dendrimères peuvent être construits étape par étape à partir d'un noyau central possédant au moins deux groupements fonctionnels

tel que par exemple l'hexachlorocyclotriphosphazène : $N_3P_3Cl_6$, qui possède six groupements fonctionnels.

De façon plus précise, ces dendrimères sont généralement construits par la répétition de deux étapes à partir du cœur. La première étape est la substitution des atomes de chlore en milieu basique par un composé difonctionnel ayant une fonction alcool et une fonction aldéhyde, par exemple le 4-hydroxybenzaldéhyde. La deuxième étape crée les points de ramification et consiste en une réaction de condensation avec un composé ayant deux types de fonctions : un groupement NH_2 et au moins un groupement PCl_2 comme par exemple le composé $H_2NNMeP(S)Cl_2$. Les deux premières étapes de la méthode de synthèse à partir du cœur hexafonctionnel sont représentées sur le schéma de synthèse A représenté sur la figure 4 annexée.

Une suite itérative des étapes de synthèse permet de construire des dendrimères de génération croissante.

Le tableau I ci-après indique le nombre de fonctions terminales présentes à la périphérie des dendrimères de différentes générations obtenus à partir du cœur N_3P_3 ainsi que leur taille en Angströms :

Tableau I

Génération	Nombre de fonctions	Taille (Å)
1	12	30
2	24	45
3	48	60
4	96	75
5	192	90
6	384	105
7	768	120

La présente Invention a également pour objet un procédé de préparation d'un support solide conforme à l'Invention (dendrilame), caractérisé par le fait qu'il comprend une étape de formation d'une liaison covalente entre des dendrimères phosphorés possédant un noyau central qui contient au moins deux groupements fonctionnels, lesdits dendrimères comportant à leur périphérie plusieurs fonctions aptes à permettre leur fixation sur ladite surface et la fixation ou la synthèse *in situ* de molécules d'intérêt, et la surface fonctionnalisée ou non d'un support solide

pour obtenir un support solide fonctionnalisé de façon covalente par lesdits dendrimères.

Selon une première forme de réalisation du procédé conforme à l'Invention, les dendrimères comportent à leur périphérie des fonctions permettant l'accrochage direct par l'intermédiaire d'une liaison covalente de ces derniers sur la surface non préalablement fonctionnalisée dudit support solide. C'est le cas, en particulier, lorsque les dendrimères comportent à leur périphérie des fonctions thiol et que le support solide comprend une surface d'or.

Selon une seconde forme de réalisation du procédé conforme à l'Invention, et lorsque la surface du support solide utilisé ne comprend pas de fonctions compatibles avec les fonctions périphériques du dendrimères utilisé, il est alors nécessaire de fonctionnaliser préalablement ladite surface au moyen de fonctions aptes à permettre la fixation covalente desdits dendrimères.

Selon cette seconde variante, le procédé conforme à l'Invention est alors caractérisé par le fait qu'il comprend les étapes suivantes :

a) la fonctionnalisation d'au moins une surface d'un support solide par des fonctions aptes à permettre la fixation de dendrimères phosphorés possédant un noyau central qui contient au moins deux groupements fonctionnels, lesdits dendrimères comportant à leur périphérie plusieurs fonctions aptes à permettre leur fixation sur ladite surface ainsi fonctionnalisée et la fixation ou la synthèse *in situ* de molécules d'intérêt ;

b) la réactivation éventuelle des fonctions du support pour obtenir une surface fonctionnalisée activée,

c) la formation d'une liaison covalente entre lesdits dendrimères et ladite surface fonctionnalisée et éventuellement activée, pour obtenir un support solide fonctionnalisé de façon covalente par lesdits dendrimères.

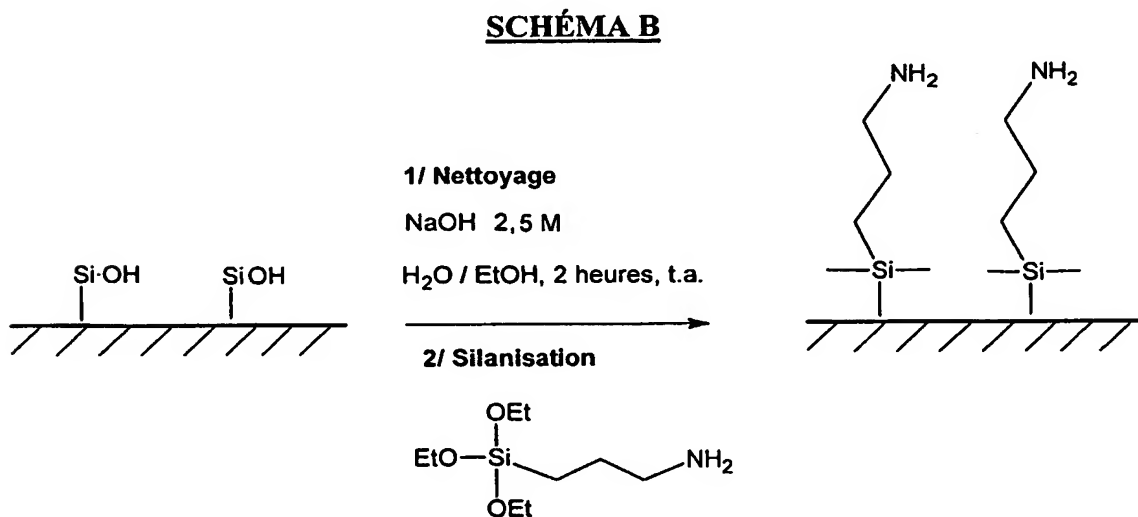
Selon une forme de réalisation avantageuse de l'Invention, l'étape a) de fonctionnalisation de la surface du support solide est réalisée par silanisation au moyen d'un réactif de silanisation comportant des fonctions aptes à fixer les dendrimères, telles que par exemple des groupements amine.

A titre d'exemple, l'étape de silanisation peut être réalisée en utilisant un réactif de silanisation aminé tel que par exemple le

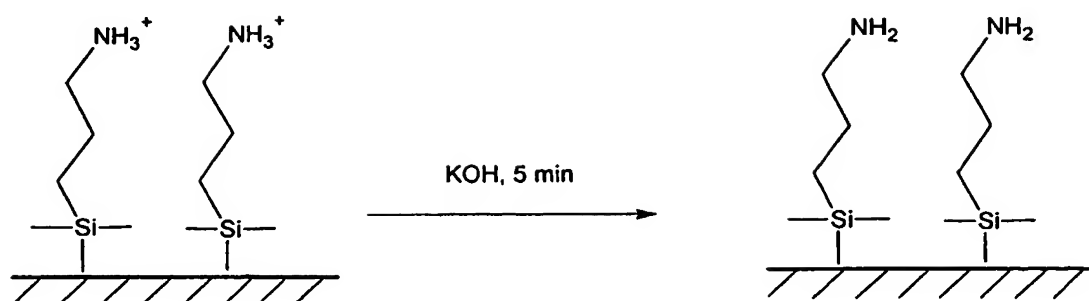
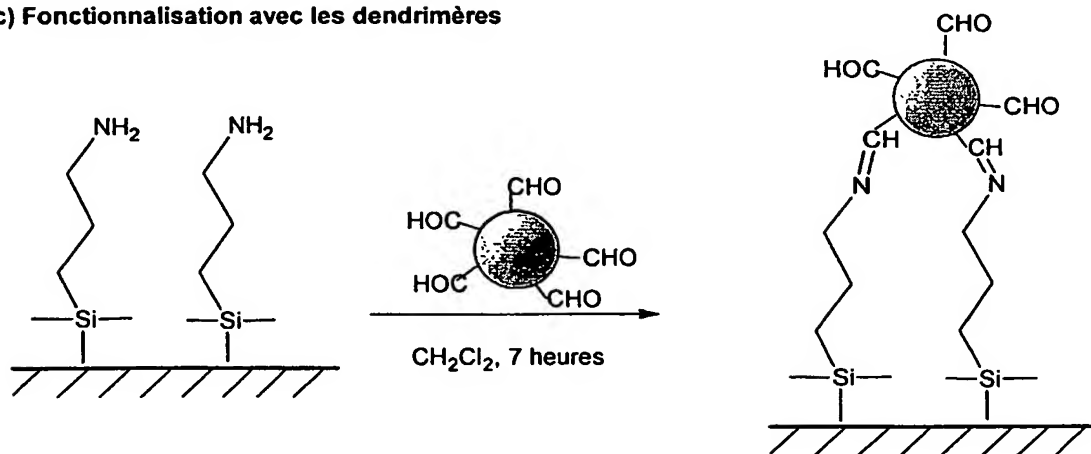
3-aminopropyltriéthoxysilane (Sigma), l'aminopropyl-diéthoxyméthylsilane ou bien encore l'aminopropylmonoéthoxydiméthylsilane.

Selon une forme de réalisation préférée de l'Invention, l'étape de fixation covalente directe des dendrimères (cas de la première variante) et l'étape a) de silanisation de la surface du support (cas de la deuxième variante) sont précédées d'une étape de nettoyage de la surface du support en milieu basique, acide et/ou oxydant.

Dans le cas particulier de la deuxième variante du procédé conforme à l'Invention, ces deux étapes de lavage et de silanisation sont résumées sur le schéma de synthèse B ci-dessous :



L'étape b) optionnelle de préactivation sert à réactiver si nécessaire les fonctions amine fixées sur le support à l'issue de l'étape de silanisation. En effet, le stockage, même court, des supports solides aminés peut entraîner une protonation des groupements NH_2 . Il est donc souvent préférable de réactiver les fonctions amine en milieu basique avant de faire réagir les dendrimères. Dans ce cas particulier, les étapes b) et c) sont représentées sur le Schéma C ci-après :

SCHEMA C**b) Préactivation****c) Fonctionnalisation avec les dendrimères**

Selon une forme de réalisation avantageuse du procédé conforme à l'Invention, cette étape de préactivation est réalisée par traitement du support à l'aide d'un agent alcalinisant tel que par exemple la potasse, pendant une durée comprise entre 2 et 20 minutes environ.

Selon une forme de réalisation avantageuse de l'Invention, l'étape de fixation covalente des dendrimères, consiste à :

- préparer une solution desdits dendrimères dans un solvant, tel que par exemple le dichlorométhane ou le tétrahydrofurane,
- mettre ladite solution de dendrimères en contact avec la surface éventuellement fonctionnalisée et éventuellement activée, pendant une durée comprise entre 10 minutes et 24 heures environ, de préférence entre 2 et 8 heures environ, à une température de préférence comprise entre 4 et 50°C environ.

A l'issue de l'étape de fixation covalente des dendrimères, les supports conformes à l'Invention (dendrilames) sont de préférence rincés puis séchés.

L'étape de rinçage est de préférence réalisée à l'aide d'un solvant organique tel que le dichlorométhane ou le tétrahydrofurane puis à l'aide d'un alcool
5 inférieur tel que l'éthanol.

Le séchage des dendrilames peut par exemple être effectué à l'air comprimé, sous courant d'azote ou bien encore par centrifugation.

Les dendrilames ainsi obtenues peuvent ensuite être stockées et/ou directement utilisées pour l'immobilisation et/ou la synthèse *in situ* de molécules, en
10 particulier de molécules biologiques.

Les dendrilames conformes à l'Invention peuvent en particulier être stockées pendant au moins deux mois, sans qu'aucune altération des fonctions situées à la périphérie des dendrimères ne se produise.

La présente Invention a donc également pour objet l'utilisation d'un
15 support solide fonctionnalisé par des dendrimères phosphorés conformes à l'Invention (dendrilames), comme support pour l'immobilisation et/ou la synthèse *in situ* de molécules d'intérêt telles que par exemple des molécules d'acide nucléique (oligonucléotides, produits PCR...), des lipides, des protéines (peptides, enzymes, anticorps, ...) ou leurs partenaires moléculaires.

20 L'Invention a aussi pour objet une biopuce caractérisée par le fait qu'elle est constituée d'un support solide comportant au moins une surface fonctionnalisée par des dendrimères phosphorés sur lesquels sont fixées de façon covalente des molécules d'intérêt telles que des acides nucléiques (oligonucléotides, produits PCR...), des lipides, des protéines (peptides, enzymes, anticorps, ...) ou leurs
25 partenaires moléculaires.

Selon l'Invention, de telles biopuces sont appelées « dendripuces ».

De telles dendripuces possèdent un bruit de fond très bas et une intensité de signal élevée par exemple après hybridation d'acides nucléiques avec des cibles fluorescentes. Ces "dendripuces" présentent l'avantage d'être réutilisables sans
30 perte significative du signal mais surtout sans augmentation du bruit de fond. Ceci entraîne une réduction significative des coûts d'analyse et permet d'obtenir des données statistiques fiables pour une analyse donnée. Ces dendripuces sont de plus

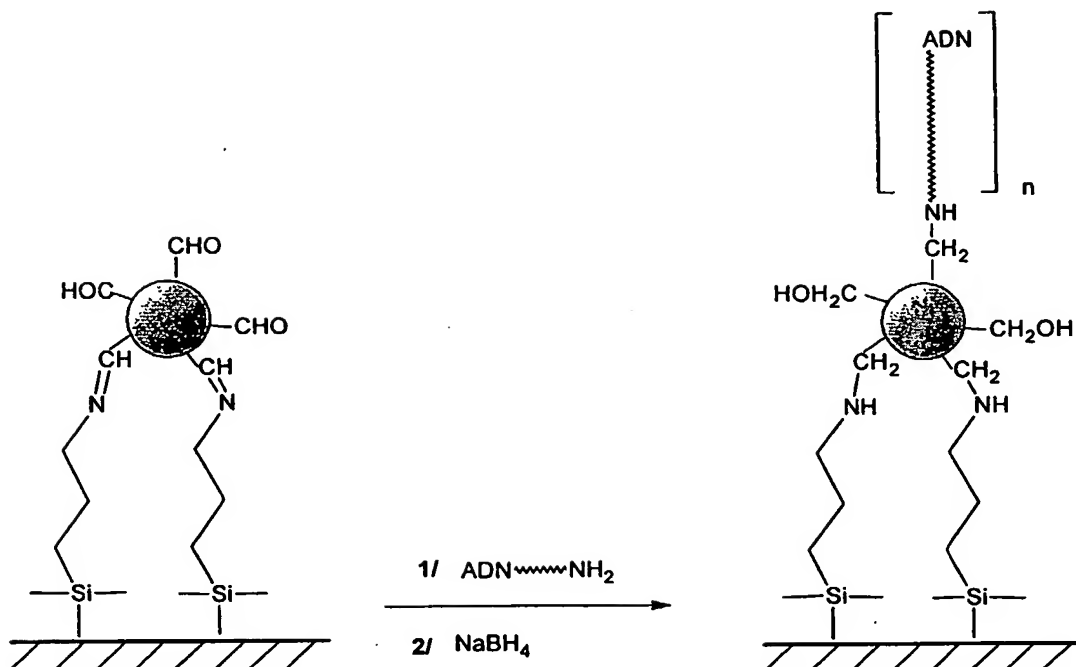
obtenues en peu d'étapes de synthèse (trois à cinq) ; celles-ci se déroulant dans des conditions opératoires non contraignantes, de manière contrôlée et reproductible.

Par ailleurs, du fait de la structure même des dendrimères, ces dendripuces présentent l'avantage de posséder de multiples points d'ancrage sur la surface d'une part et sur les molécules d'intérêt d'autre part, le tout garantissant une
5 excellente stabilité de l'ensemble support-dendrimères-molécules d'intérêt.

Un autre objet de l'Invention est un procédé de préparation d'une dendripuce telle que définie ci-dessus, caractérisé par le fait qu'il consiste à mettre en contact un support solide ayant au moins une surface fonctionnalisée par des
10 dendrimères phosphorés comportant à leur périphérie des fonctions aptes à permettre la fixation covalente de molécules d'intérêt avec une solution tampon renfermant des molécules d'intérêt préalablement fonctionnalisées par, ou comportant déjà, un ou plusieurs groupements aptes à former une liaison covalente avec lesdites fonctions périphériques des dendrimères.

15 Selon une première forme de réalisation de ce procédé, et lorsque les fonctions périphériques des dendrimères utilisés sont des fonctions aldéhydes, alors les molécules d'intérêt sont de préférence préalablement fonctionnalisées par, ou contiennent déjà, une ou plusieurs fonctions amine, ou sont préalablement fonctionnalisées par une ou plusieurs fonctions oxyamine (-ONH₂) ou hydrazine
20 (-NH-NH₂), et de manière plus générale par toute fonction susceptible de réagir avec une fonction aldéhyde.

Aussi, dans ce cas, les molécules d'intérêt (acides nucléiques aminés, oligonucléotides de tailles variables ou produits PCR), sont déposés sur les "dendrilames" en utilisant, par exemple, le tampon phosphate 0,3 M, pH 9. Lorsque
25 les molécules d'intérêt sont préalablement fonctionnalisées par, ou contiennent déjà, une ou plusieurs fonctions amine, cette étape est suivie d'une réduction des fonctions imines présentes entre les acides nucléiques et les dendrimères d'une part et entre les dendrimères et le support d'autre part (voir Schéma D ci-après). Cette étape de réduction permet également de réduire les fonctions aldéhydes résiduelles en alcool
30 rendant la surface hydrophile. De plus, les alcools ne peuvent pas entraîner de réaction non spécifique avec les cibles marquées (pas d'augmentation du bruit de fond).

SCHÉMA D

Selon une deuxième forme de réalisation de ce procédé, et lorsque les fonctions périphériques des dendrimères utilisés sont des fonctions thiol, alors les molécules d'intérêt sont de préférence préalablement fonctionnalisées par, ou contiennent déjà, une ou plusieurs fonctions thiol (pour permettre la création d'un pont disulfure), ou sont préalablement fonctionnalisées par une ou plusieurs fonctions iodoacétamido (-NHCO-CH₂-I), et de manière plus générale, par toute fonction susceptible de réagir avec une fonction thiol. Ce type de fonctionnalisation est particulièrement adapté aux supports solides comportant une surface de type silicium ou en or. Dans le cas d'un lien disulfure établi entre le support et les sondes nucléiques, la surface peut être régénérée par une étape de réduction. La surface thiol ainsi obtenue peut être à nouveau "rechargée" avec d'autres séquences oligonucléotidiques ou avec des protéines.

Selon une troisième forme de réalisation de ce procédé, et lorsque les fonctions périphériques des dendrimères utilisés sont des fonctions amines, alors les molécules d'intérêt sont préalablement fonctionnalisées par, ou contiennent déjà une ou plusieurs fonctions aldéhyde, α -oxoaldéhyde, -COOR, -NCS, -NHS, et de

manière plus générale, par toute fonction capable de réagir avec une fonction amine.

Selon une quatrième forme de réalisation de ce procédé, et lorsque les fonctions périphériques des dendrimères utilisés sont des fonctions époxyde, alors les molécules d'intérêt sont préalablement fonctionnalisées par, ou contiennent déjà
5 une ou plusieurs fonctions amine, et de manière plus générale, par toute fonction capable de réagir avec une fonction époxyde.

Selon le procédé de préparation des dendripuces conforme à l'Invention, la réaction de fixation covalente des molécules d'intérêt sur les dendrilames est de préférence réalisée à une température comprise entre 4 et 50°C
10 environ, pendant une durée comprise entre 2 et 24 heures environ.

Les dendripuces ainsi obtenues peuvent avantageusement être utilisées en tant qu'outil de diagnostic miniaturisé, en fonction de la nature des molécules d'intérêt fixées, comme puces à ADN par exemple pour réaliser des réactions d'hybridation avec des cibles complémentaires, comme puces à peptides, à
15 polypeptides ou à protéines par exemple pour la détection de réponses de type antigène-anticorps par l'utilisation de réactifs marqués, fluorescents, radioactifs ou marqués chimiquement.

Les dendripuces conformes à la présente Invention peuvent également être utilisées comme puces à polypeptides pour le criblage de molécules et
20 pour l'analyse des relations entre molécules, de type ligand-récepteur.

De telles dendripuces présentent en particulier l'avantage d'être réutilisables.

Outre les dispositions qui précèdent, l'Invention comprend encore d'autres dispositions qui ressortiront de la description qui va suivre, qui se réfère à
25 deux exemples de préparation de dendrilames en verre fonctionnalisées par des dendrimères de différentes générations et à extrémités aldéhyde, à un exemple de préparation de biopuces à partir de ces dendrilames, à un exemple d'immobilisation de molécules d'acide nucléique sur des biopuces conformes à l'Invention, à un exemple de synthèse d'un dendrimère de génération 3 et à extrémités thiol et à un exemple de
30 préparation de dendrilames avec des dendrimères de génération 3 à extrémités thiol, ainsi qu'aux figures 1 à 7 dans lesquelles :

- la figure 1 représente une vue schématique d'un dendrimère de

génération 4, obtenu à partir d'un cœur trifonctionnel ;

- la figure 2 représente la formule d'un dendrimère phosphoré de génération 4 comportant des fonctions périphériques terminales aldéhydes ;

- la figure 3 représente la formule d'un dendrimère phosphoré de génération 3 à fonctions périphériques terminales thiol ;

- la figure 4 est un schéma de synthèse A représentant les deux premières étapes du procédé de préparation d'un dendrimère à cœur phosphoré ;

- la figure 5 représente les images des signaux de fluorescence obtenus après 10 cycles d'hybridation/déshybridation sur des dendripuces conformes à l'Invention ;

- la figure 6 représente les images des signaux de fluorescence obtenus après 10 cycles d'hybridation/déshybridation sur des dendripuces conformes à l'Invention en fonction de la concentration en oligonucléotides cibles ;

- la figure 7 représente les images des signaux de fluorescence obtenus lors d'une étude concernant la recherche de mutations sur des oligonucléotides.

EXEMPLE 1 : PRÉPARATION D'UN SUPPORT SOLIDE CONSTITUE PAR UNE LAME DE VERRE FONCTIONNALISÉE PAR DES DENDRIMÈRES PHOSPHORES A EXTRÉMITÉS ALDÉHYDE ("DENDRILAMES")

1) Première étape : Préactivation des lames de verre

Des lames de verre commerciales, fonctionnalisées par des groupements amine (CORNING®-CMT-GAPS Amino-Silane Coated Slides) sont immergées dans une solution aqueuse de potasse (8 %) pendant 20 minutes sous agitation à l'aide d'un agitateur orbital à une vitesse de 30 rotations par minute (Heidolph Instruments Polymax 1040). Les lames sont ensuite abondamment rincées avec de l'eau milliQ (3 lavages de 5 minutes chacun) et sont enfin séchées sous courant d'azote.

2) Deuxième étape : Préparation des "dendrilames"

Dans cet exemple, trois types de dendrimères différents ont été utilisés :

- Dendrimères G3 : Dendrimères de troisième génération comportant un cœur phosphoré de formule (IIIa) telle que décrite ci-dessus et comportant à leur périphérie 48 fonctions aldéhydes ;

5 - Dendrimères G4 : Dendrimères de quatrième génération comportant un cœur phosphoré de formule (IIIa) telle que décrite ci-dessus et comportant à leur périphérie 96 fonctions aldéhydes ;

 - Dendrimères G5 : Dendrimères de cinquième génération comportant un cœur phosphoré de formule (IIIa) telle que décrite ci-dessus et comportant à leur périphérie 192 fonctions aldéhydes ;

10 Les lames préactivées sont immergées dans une solution de dendrimères G3, G4 ou G5 à 0,1% dans du dichlorométhane. Elles sont agitées pendant 6 heures à température ambiante (30 rotations/mn). Elles sont ensuite rincées avec du dichlorométhane (2 lavages de 5 minutes chacun) puis avec de l'éthanol (1 lavage de 5 minutes) et sont enfin séchées sous courant d'azote.

15 On obtient ainsi des lames de verre dont la surface est fonctionnalisée par des dendrimères de G3, G4 ou G5 (dendrilames : DL-A-G3 ; DL-A-G4 et DL-A-G5). Ces dendrilames peuvent ensuite être utilisées pour l'immobilisation de molécules d'intérêt.

20 **EXEMPLE 2 : PRÉPARATION D'UN SUPPORT SOLIDE CONSTITUÉ PAR UNE LAME DE VERRE FONCTIONNALISÉE PAR DES DENDRIMÈRES PHOSPHORÉS A EXTRÉMITÉS ALDÉHYDE ("DENDRILAMES")**

1) Première étape : Nettoyage des lames de verre

25 Des lames de verre commerciales (Gold-Seal-Microslides®, Polylabo) sont placées sur un portoir et celui-ci est immergé dans une solution alcaline de lavage constituée de 50 g de soude dans 200 ml d'eau milliQ et de 300 ml d'éthanol à 95%. Les lames sont agitées pendant 2 heures à température ambiante. Elles sont ensuite abondamment rincées avec de l'eau milliQ (3 lavages de 5 minutes chacun) et séchées sous courant d'azote ou par centrifugation.

2) Deuxième étape : Silanisation

30 Les lames de verre ainsi nettoyées sont immergées dans une solution de 3-aminopropyltriéthoxysilane (GAPS, Aldrich) à 10 % dans l'éthanol à 95 % et sont placées sous agitation pendant une nuit à température ambiante. Elles sont ensuite

laissées pendant 30 minutes à l'air libre, rincées avec de l'éthanol à 95 % (2 lavages de 5 minutes chacun) puis avec de l'eau milliQ (1 lavage de 5 minutes et 1 lavage de 2 minutes avec sonication) avant d'être séchées sous courant d'azote. Elles sont ensuite placées pendant 3 heures à une température de 120°C.

5 **3) Troisième étape : Préactivation**

Les lames silanisées sont placées dans une solution aqueuse de potasse (8 %) pendant 5 minutes, sous agitation à température ambiante. Elles sont ensuite rincées avec de l'eau milliQ (3 lavages de 5 minutes chacun) avant d'être séchées sous courant d'azote.

10 **4) Quatrième étape : Fonctionnalisation avec les dendrimères**

Les lames préactivées sont placées dans une solution de dendrimères G4 tel que décrit ci-dessus à l'exemple 1 (0,1 % dans du dichlorométhane) pendant 7 heures sous agitation à température ambiante. Elles sont ensuite lavées avec du dichlorométhane (2 lavages de 5 minutes chacun) puis avec de l'éthanol (1 lavage de 5 minutes) avant d'être séchées sous courant d'azote.

On obtient ainsi un support solide fonctionnalisé par des dendrimères phosphorés à fonctions aldéhydes (dendrilame : DL-B-G4). Cette dendrilame peut ensuite être utilisée pour l'immobilisation de molécules d'intérêt.

20 **EXEMPLE 3 : PRÉPARATION DE BIOPUCES A PARTIR DES DENDRILAMES PRÉPARÉES AUX EXEMPLES 1 ET 2 : "DENDRIPUCES"**

1) Dépôt des oligonucléotides

a) Oligonucléotides utilisés

Oligonucléotide ON1 : 35 mer-amine ayant la séquence SEQ ID N°1 suivante :

25 5' -GTG-ATC-GTT-GTA-TCG-AGG-AAT-ACT-CCG-ATA-CCA-TT -3', modifié en position 5' par un groupement - NH₂-(CH₂)₆-.

Cet oligonucléotide, qui est modifié à son extrémité 5' par un bras à 6 carbones terminé par une fonction amine (Eurogentec, Belgique), permet la réaction avec les fonctions aldéhydes présentes sur la dendrilame telle que décrite ci-dessus aux exemples 1 et 2.

Oligonucléotide ON2 : 35 mer-oxyamine ayant la séquence SEQ ID N°1 décrite ci-dessus et modifié en position 5' par un - H₂NO-(CH₂)₆-.

La séquence SEQ ID N°1 des oligonucléotides ON1 et ON2 correspond à une partie du gène GPH1 de la levure *Saccharomyces cerevisiae*.

Les dépôts des oligonucléotides ont été effectués en utilisant le robot Eurogridder® (Eurogentec, Seraing, Belgique) et ont été espacés de 200 µm.

5 b) Dépôts sur les dendrilames

On utilise les dendrilames DL-A-G3, DL-A-G4, DL-A-G5 et DL-B-G4 telles que préparées ci-dessus aux exemples 1 et 2.

Sur les dendrilames DL-A-G3, DL-A-G4, DL-A-G5 préparées à l'exemple 1, les oligonucléotides ON1 sont déposés dans un tampon phosphate 0,3 M (pH 9) contenant des quantités croissantes de diméthylsulfoxyde (DMSO) (0 ; 10 ; 20 ; 30 ; 40 ou 50 %, v/v) en utilisant le robot Eurogridder® (Eurogentec, Belgique). Les volumes déposés sont de 2 nl et les concentrations varient de 1 µM à 10 µM (1 ; 2 ; 5 et 10 µM). Après dépôt les lames sont laissées pendant une nuit à température ambiante. Elles sont ensuite immergées dans une solution aqueuse de borohydrure de sodium (NaBH₄, 3,5 mg/mL) (étape de réduction des fonctions imines) et sont agitées pendant 3 heures à température ambiante. Elles sont rincées avec de l'eau MilliQ (3 lavages de 5 minutes chacun) et sont séchées sous courant d'azote ou par centrifugation. On obtient les dendripuces (DP) suivantes DP1-A-G3 ; DP1-A-G4 et DP1-A-G5.

Sur les dendrilames DL-B-G4 préparées à l'exemple 2, les oligonucléotides ON1 sont déposés dans le tampon phosphate 0,3 M (pH 9) en utilisant le robot de dépôt. Les volumes déposés sont de 2 nl et la concentration est de 10 µM. Après dépôt les lames sont laissées pendant une nuit à une température ambiante. Elles sont ensuite immergées dans une solution aqueuse de borohydrure de sodium (NaBH₄, 3,5 mg/mL) (étape de réduction des fonctions imines) et sont agitées pendant 3 heures à température ambiante. Elles sont rincées avec de l'eau MilliQ (3 lavages de 5 minutes chacun) et sont séchées sous courant d'azote ou par centrifugation. On obtient des dendripuces DP1-B-G4.

Les oligonucléotides ON2 ont également été déposés sur les dendrilames préparées à l'exemple 2.

30 Pour ce faire, les oligonucléotides ON2 sont déposés dans l'eau MilliQ. Les volumes déposés sont de 0,2 µl et les concentrations varient de 1 µM à 10 µM (1 µM, 5 µM et 10 µM). Sur la même lame les oligonucléotides ON1 ont été

déposés dans le tampon phosphate 0,3 M dans les mêmes conditions de volume et de concentration. Les lames sont laissées pendant 7 heures à température ambiante. Elles sont ensuite immergées dans une solution aqueuse de borohydrure de sodium (NaBH_4 , 3,5 mg/mL) et sont agitées pendant 3 heures à température ambiante. Elles sont
5 ensuite rincées avec de l'eau MilliQ (1 lavage de 5 minutes), avec une solution aqueuse de dodécylsulfate de sodium (SDS) à 0,2 % (1 lavage de 5 minutes) et à nouveau avec de l'eau (5 minutes). Elles sont enfin séchées sous courant d'azote. On obtient des dendripuces DP2-B-G4.

On obtient ainsi différentes sortes de biopuces correspondant à des
10 dendrilames sur lesquelles ont été fixés des oligonucléotides ("dendripuces"). Ces dendripuces peuvent ensuite être utilisées dans des réactions d'hybridation.

EXEMPLE 4 : HYBRIDATION

1) Matériel et méthodes

1-a) Tampons utilisés

15 Les différents tampons utilisés lors des étapes d'hybridation sont reportés ci-dessous ; ils ont été préparés à partir des différentes solutions commerciales suivantes :

- 20 x SSC (citrate de sodium 0,3 M ; NaCl 3 M, pH environ 7 ; Sigma)
- 20 x SSPE (Tampon Phosphate 0,2 M, 2,98 M NaCl, 0,02 M EDTA, pH environ
20 7,4 ; Sigma),
- 50 x Solution de Denhardt (Sigma),
- ADN saumon (9,9 mg/mL, Sigma).

Tampon d'hybridation : SSPE 2 x, SDS 0,1% [ON cible] = 200 nM, pH 7,4

Avec comme oligonucléotides cibles :

- 25 ON-Cy5 : 5' - Cy5 — AAT GGT ATC GGA GTA - 3'
ON-Cy3 : 5' - Cy3 — AAT GGT ATC GGA GTA - 3'

La séquence de ces oligonucléotides cibles correspond à la séquence

SEQ ID N°2.

Tampon de lavage : SSPE 2x, SDS 0,1%, pH 7,4 :

30 Tampon de déshybridation : 2,5 mM Na_2HPO_4 , 0,1% SDS

1-b) Etape d'hybridation

Les hybridations sont réalisées en ajoutant le volume nécessaire de cibles marquées (de 2 µl à 40 µl suivant la surface à couvrir) sur la zone de dépôt de chaque dendripuce.

- 5 Différentes concentrations de cibles à détecter : 200 nM, 100 nM, 20 nM, 10 nM, 2 nM et 1 nM ont été préparées et utilisées au cours des étapes d'hybridation afin d'évaluer la sensibilité de détection des dendripuces conformes à l'Invention.

- 10 La goutte est alors recouverte d'une lamelle et l'ensemble est placé dans une chambre d'hybridation (« CMT-Hybridization Chamber » vendue par la société Corning). Les lames sont laissées pendant 15 minutes à température ambiante et sont ensuite lavées en utilisant le tampon de lavage pendant 5 minutes à température ambiante. Elles sont enfin séchées sous courant d'azote.

1-c) Lecture des lames

- 15 La lecture des lames est réalisée en utilisant un scanner Axon équipé de deux lasers permettant une lecture à des longueurs d'ondes d'excitation de 532 nm et de 635 nm (Cy3 et Cy5 respectivement). La fluorescence émise par les fluorochromes après excitation est détectée par un tube photo-multiplicateur (PMT). Classiquement le PMT a une valeur comprise entre 450 et 600. Le résultat est obtenu sous forme d'un fichier
20 image avec une résolution de 10 µm/pixel. L'analyse informatique des fichiers images et la quantification de l'intensité de fluorescence ont été réalisées en utilisant le logiciel Genepix®.

1-d) Etape de déshybridation

- 25 Lorsque la lecture des lames est terminée, on procède à la déshybridation des lames.

- 30 Pour ce faire, les dendripuces sont placées dans un tube Flacon de 50 ml rempli avec le tampon de déshybridation décrit ci-dessus. L'ensemble est placé pendant 5 minutes à 95°C. La lame est alors rincée trois fois avec de l'eau milliQ et séchée par centrifugation ou sous courant d'azote. La lame est ensuite scannée afin de s'assurer que la déshybridation a bien eu lieu. Elle est ainsi prête pour être à nouveau utilisée pour une autre hybridation.

1-e) Etude de mutationsDépôts :

L'oligonucléotide ON1 tel que décrit ci-dessus (10 μ M, 2 nl) est déposé sur les dendrilames DL-A-G3, DL-A-G4 ou DL-A-G5 préparées selon l'exemple 1. Les dépôts sont effectués en quatre endroits différents sur la même dendrilame. Les hybridations sont effectuées en utilisant quatre oligonucléotides de 15 bases fonctionnalisés à leurs extrémités 5' par un fluorophore Cy5 et qui contiennent en milieu de séquence les quatre bases possibles T, A, G ou C (Eurogentec). Les séquences de ces oligonucléotides sont les suivantes :

10 - "15mer Cy5 T" (complémentaire) : 5' - Cy5—AAT GGT ATC GGA GTA 3' (SEQ ID N°2)

- "15mer Cy5 A" : 5' - Cy5—AAT GGT AAC GGA GTA 3' (SEQ ID N°3)

- "15mer Cy5 G" : 5' - Cy5—AAT GGT AGC GGA GTA 3' (SEQ ID N°4)

- "15mer Cy5 C" : 5' - Cy5—AAT GGT ACC GGA GTA 3' (SEQ ID N°5)

15 Hybridations

- Tampon d'hybridation : SSC 6x, SDS 0,2%, solution de Denhardt 5x, ADN saumon 10 μ g, pH 7 contenant l'oligonucléotide 15mer Cy5 T, A, G ou C à une concentration de 200 nM.

- Tampon de lavage : lavage 1 : SSC 2x, 0,1% SDS, pH 7

20 lavage 2 : SSC 0,2x.

On dépose 5 μ l de chacune des solutions d'hybridation sur chaque zone de dépôt constituée d'oligonucléotide ON1. On recouvre chaque zone d'une lamelle (sans que les lamelles ne se touchent). On place la lame dans une chambre d'hybridation (Corning) que l'on plonge dans un bain à 42°C pendant une heure. Les lames sont ensuite lavées avec le tampon de lavage 1 pendant 5 minutes à température ambiante ou à 50°C puis avec le tampon de lavage 2 pendant 5 minutes à 50°C. Elles sont enfin séchées sous courant d'azote.

25

30.

2) Résultats**2-a) Réutilisation des dendripuces et sensibilité de la détection en fonction de la nature du tampon de dépôt, de la concentration en ON et de la nature des dendrimères**

5 Sur les dendripuces DP1-A-G3, DP1-A-G4 et DP1-A-G5, et pour chaque concentration testée de cibles à détecter, les étapes d'hybridation, de lecture des lames et de déshybridation ont été effectuées 7 fois avec l'ON 15-mer Cy5 (200 nM), afin de démontrer le caractère réutilisable des dendripuces conformes à l'Invention, ainsi que la sensibilité et la reproductibilité des résultats obtenus. Les
10 valeurs d'intensité de fluorescence sont regroupées dans les Tableaux II à IV ci-après ; le PMT a valeur de 600 et les dépôts ont été réalisés en triplicata pour chaque tampon :

15

20

25

30

TABLEAU II

DP1-A-G3 : APRÈS LA PREMIÈRE HYBRIDATION					
Concentration ON1 : 5 μ M			Concentration ON1 : 10 μ M		
Concentration DMSO (%)	Diamètre des dépôts (μ m)	Signal/Bruit	Concentration DMSO (%)	Diamètre des dépôts (μ m)	Signal/Bruit
0	90	65000/200	0	100	65000/200
10	110	65000/200	10	110	65000/200
20	110	65000/200	20	140	65000/200
30	140	65000/200	30	140	65000/200
40	140	65000/200	40	150	65000/200
50	160	42000/200	50	160	50000/200
APRÈS SEPT HYBRIDATIONS					
Concentration ON1 : 5 μ M			Concentration ON1 : 10 μ M		
Concentration DMSO (%)	Diamètre des dépôts (μ m)	Signal/Bruit	Concentration DMSO (%)	Diamètre des dépôts (μ m)	Signal/Bruit
0	90	65000/300	0	100	65000/350
10	110	65000/300	10	110	65000/350
20	110	65000/300	20	140	65000/350
30	140	65000/300	30	140	65000/350
40	140	65000/300	40	150	65000/350
50	160	50000/300	50	160	50000/350

TABLEAU III

DP1-A-G4 : APRÈS LA PREMIÈRE HYBRIDATION					
Concentration ON1 : 5 μ M			Concentration ON1 : 10 μ M		
Concentration DMSO (%)	Diamètre des dépôts (μ m)	Signal/Bruit	Concentration DMSO (%)	Diamètre des dépôts (μ m)	Signal/Bruit
0	90	65000/300	0	100	65000/300
10	120	65000/300	10	110	65000/300
20	120	53000/300	20	110	65000/300
30	140	65000/300	30	170	65000/300
40	160	65000/300	40	190	65000/300
50	170	53000/200	50	180	65000/200
APRÈS SEPT HYBRIDATIONS					
Concentration ON1 : 5 μ M			Concentration ON1 : 10 μ M		
Concentration DMSO (%)	Diamètre des dépôts (μ m)	Signal/Bruit	Concentration DMSO (%)	Diamètre des dépôts (μ m)	Signal/Bruit
0	90	65000/300	0	100	65000/350
10	110	65000/300	10	110	65000/350
20	110	56000/300	20	140	45000/350
30	140	52000/300	30	140	65000/350
40	140	65000/300	40	150	65000/350
50	160	48000/300	50	160	51000/350

TABLEAU IV

DPI-A-G5 : APRÈS LA PREMIÈRE HYBRIDATION					
Concentration ON1 : 5 μM			Concentration ON1 : 10 μM		
Concentration DMSO (%)	Diamètre des dépôts (μm)	Signal/Bruit	Concentration DMSO (%)	Diamètre des dépôts (μm)	Signal/Bruit
0	100	65000/200	0	90	65000/200
10	110	65000/200	10	100	65000/200
20	130	65000/200	20	120	45000/200
30	160	38000/200	30	170	65000/200
40	170	65000/200	40	180	65000/200
50	180	47000/200	50	170	48000/200
APRÈS SEPT HYBRIDATIONS					
Concentration ON1 : 5 μM			Concentration ON1 : 10 μM		
Concentration DMSO (%)	Diamètre des dépôts (μm)	Signal/Bruit	Concentration DMSO (%)	Diamètre des dépôts (μm)	Signal/Bruit
0	90	65000/500	0	100	65000/500
10	110	65000/500	10	110	65000/500
20	110	56000/500	20	140	45000/500
30	140	52000/500	30	140	65000/500
40	140	60000/500	40	150	62000/500
50	160	42000/500	50	160	60000/500

5 Ces résultats montrent que les rapports signal/bruit sont pratiquement constants entre la première et la septième hybridation. Ces résultats démontrent que les dendripuces conformes à l'Invention peuvent être réutilisées sans diminution du rapport signal/bruit.

De plus, ces résultats montrent que les rapports signal/bruit obtenus avec les différentes concentrations de tampon sont très proches et donc significatifs de la reproductibilité et de la sensibilité des mesures.

De la même manière, 10 cycles d'hybridation et de déshybridation ont été réalisés sur les dendriputes DP1-B-G4 telles que préparées ci-dessus à l'exemple 2.

Les résultats obtenus, sous la forme d'images des signaux de fluorescence, sont représentés sur la figure 5.

Ces résultats montrent que le rapport signal/bruit après la première hybridation (65000/200) est le même après la dixième hybridation et donc significatif du caractère réutilisable des dendriputes conformes à la présente Invention.

2-b) Réutilisation des dendriputes et sensibilité de la détection en fonction de la concentration en ON cible et de la nature des dendrimères

L'oligonucléotide ON1 a été déposé en cinq endroits différents sur les dendriputes DP1-A-G3, DP1-A-G4 et DP1-A-G5 telles que préparées à l'exemple 3 ci-dessus.

Les solutions d'hybridation suivantes contenant des concentrations décroissantes en ON-Cy5 cible ont été utilisées afin d'évaluer la sensibilité des dendriputes conformes à l'Invention :

- SSPE 2x, SDS 0,1%, [ON- Cy5] = 200 nM
- SSPE 2x, SDS 0,1%, [ON-Cy5] = 100 nM
- SSPE 2x, SDS 0,1%, [ON-Cy5] = 20 nM
- SSPE 2x, SDS 0,1%, [ON-Cy5] = 10 nM
- SSPE 2x, SDS 0,1%, [ON-Cy5] = 2 nM
- SSPE 2x, SDS 0,1%, [ON-Cy5] = 1 nM

2 µl de chacune de ces solutions d'hybridation ont ensuite été déposés sur les dendriputes et laissés incuber pendant 15 minutes à température ambiante. Les dendriputes ont ensuite été lavées avec le tampon SSPE 2x, SDS 0,1% pendant 5 minutes à température ambiante avant d'être séchées sous courant d'azote ou par centrifugation. 10 cycles d'hybridation/déshybridation ont ainsi été effectués.

Les images obtenues sont représentées sur la figure 6.

Ces résultats montrent que pour une concentration en ON-Cy5 cible variant entre 200 nM et 10 nM, et même après 10 cycles d'hybridation/déshybridation, on obtient un rapport signal/bruit constant de 65000/200. Pour une concentration en ON-Cy5 cible inférieure, c'est-à-dire de 2nM ou de 1nM, on obtient des rapports
5 signal/bruit respectivement de 50000/200 et de 40000/200 significatifs de la très bonne sensibilité de détection des dendripuces conformes à l'Invention et de la reproductibilité des résultats qu'elles permettent d'obtenir lorsqu'elles sont réutilisées plusieurs fois.

2-b) Détection de mutations

10 Les résultats obtenus sont représentés sur la figure 7 annexée sur laquelle on peut voir que seul l'oligonucléotide parfaitement complémentaire conduit à l'obtention d'un signal de fluorescence alors qu'aucun signal de fluorescence n'est obtenu avec les oligonucléotides contenant une mutation en milieu de chaîne. Les dendripuces conformes à l'Invention permettent donc de détecter des mutations.

15 EXEMPLE 5: SYNTHÈSE D'UN DENDRIMÈRE DE GÉNÉRATION 3 A EXTRÉMITÉS THIOLS

1) Première étape : Synthèse d'un dendrimère de génération 3 à extrémités NH(Me)

A une solution de dendrimère de génération 3 (cœur N_3P_3 , Launay *et al*, pré-cité) à extrémités aldéhydes (650 mg) dans le dichlorométhane est ajoutée, à la
20 seringue, un léger excès de monométhylhydrazine (224 μ l). Après quatre heures d'agitation à température ambiante le milieu réactionnel est concentré sous pression réduite puis le dendrimère de génération 3 à extrémités NH(Me) est précipité en utilisant du diéthyldéther (3x15 ml). La poudre blanche résultante est lavée plusieurs
25 fois avec ce solvant avant d'être séchée sous pression réduite.

2) Deuxième étape : Synthèse d'un dendrimère de génération 3 à extrémités thiols

Le dendrimère de génération 3 à extrémités NH(Me) obtenu à l'étape 1) ci-dessus (1 g) est dissous dans 2,5 ml de γ -thiobutyrolactone dans un tube
30 de Schlenk. Le mélange est maintenu sous agitation pendant 3 jours à 50-55°C sous pression autogène. Après refroidissement, le brut réactionnel est lavé avec 3x50 ml de

diéthyléther pour donner un dendrimère de génération 3 possédant 48 fonctions thiols à sa périphérie.

Ce dendrimère, qui est représenté sur la figure 3 annexée, peut ensuite être utilisé pour la fabrication des dendrilames conformes à l'Invention.

- 5 Remarque : cette procédure est générale et permet d'obtenir des dendrimères à extrémités thiols de toutes les générations (Schmid *et al*, Chem. Eur. J., 2000, 6, 1693).

EXEMPLE 6 : PRÉPARATION DE "DENDRILAMES" FONCTIONNALISÉES PAR DES DENDRIMÈRES A EXTRÉMITÉS THIOLS

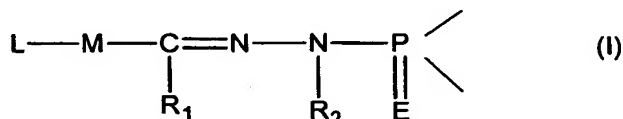
- 10 Des lames en SiO₂, SiO₂ silanisées ou SiNx sur lesquelles sont fixés des plots d'or (10 µm² à 500 µm²) sont préalablement lavées avec de l'éthanol à 95 % et séchées à l'air comprimé. Elles sont ensuite plongées pour des durées variables (15 minutes, 1 heure, 2 heures et 12 heures) dans une solution constituée de 100 µg de dendrimères de génération 3 à extrémités thiols tel que préparé ci-dessus à l'exemple
- 15 5 dissous dans 5 ml de THF distillé. Les lames sont ensuite lavées avec du THF distillé (\pm ultrasons) puis avec de l'éthanol avant d'être séchées à l'air comprimé. Le résultat du greffage (non représenté) est observé par microscopie à force atomique (AFM). Dans le cas des plots d'or sur support SiO₂, le greffage des dendrimères G3-thiols est non sélectif (fixation à la fois sur l'or et sur le support SiO₂). Dans le cas
- 20 des supports SiO₂ silanisés ou SiNx, le greffage des dendrimères G3-thiols se fait sélectivement sur les plots d'or. On obtient ainsi des lames en silicium/or dont la surface est fonctionnalisée par des dendrimères-thiol de génération 3 (dendrilames : DL-C-G3'). Ces dendrilames peuvent ensuite être utilisées pour l'immobilisation de molécules d'intérêt.

REVENDICATIONS

1. Support solide caractérisé par le fait qu'il comprend au moins une surface fonctionnalisée de façon covalente par des dendrimères phosphorés possédant un noyau central qui contient au moins deux groupements fonctionnels et comportant à leur périphérie plusieurs fonctions aptes à permettre la fixation desdits dendrimères sur ladite surface ainsi que la fixation ou la synthèse *in situ* de molécules d'intérêt, lesdits dendrimères ayant une taille comprise entre 1 et 20 nm.

2. Support solide selon la revendication 1, caractérisé par le fait que les dendrimères sont choisis parmi ceux qui sont constitués :

- d'une couche centrale sous la forme d'un noyau central P_0 , éventuellement phosphoré, comprenant de 2 à 12 groupements fonctionnalisés,
- de n couches intermédiaires, identiques ou différentes, chacune desdites couches intermédiaires étant constituée d'unités P_1 répondant à la formule (I) suivante :



dans laquelle :

L est un atome d'oxygène, de phosphore, de soufre ou d'azote,

M représente l'un des groupes suivants :

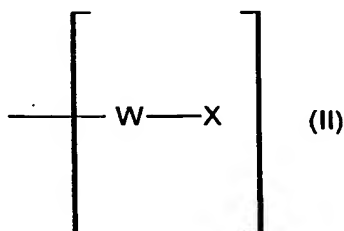
- un groupe aromatique di-, tri- ou tétrasubstitué par des groupes alkyles, des groupes alcoxy, des groupements insaturés du type oléfinique en C_1 - C_{12} , azoïques, acétylénique, tous ces groupes pouvant incorporer ou non des atomes de phosphore, d'oxygène, d'azote, de soufre ou des halogènes, ou
- un groupe alkyle ou alcoxy comportant plusieurs substituants tels que définis lorsque **M** est un groupe aromatique,

R₁ et **R₂**, qui peuvent être identiques ou différents, représentent un atome d'hydrogène ou l'un des groupes suivants : alkyle, alcoxy, aryle, comportant ou non des atomes de phosphore, d'oxygène, de soufre, d'azote ou des halogènes avec **R₂** étant le plus souvent différent de **R₁**,

n est un nombre entier compris entre 1 et 11,

E est un atome d'oxygène, de soufre ou d'azote, ledit atome d'azote pouvant être lié à un groupe alkyle, alcoxy ou aryle, tous ces groupes pouvant incorporer ou non des atomes de phosphore, d'oxygène, d'azote, de soufre ou des halogènes,

- une couche externe constituée d'unités P_2 , identiques ou différentes, et répondant à la formule II suivante :

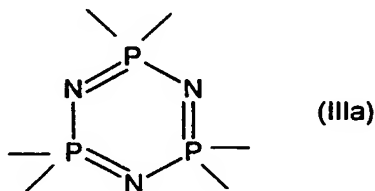


dans laquelle :

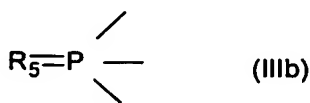
W représente l'un des groupes suivants : alkyle, alcoxy, aryle, tous ces groupes comportant ou non des atomes de phosphore, d'oxygène, d'azote, de soufre ou des halogènes,

X représente un groupement aldéhyde, thiol, amine, époxyde, acide carboxylique, alcool ou phénol.

3. Support solide selon la revendication 2, caractérisé par le fait que le noyau central P_0 est sélectionné dans le groupe constitué par le groupement de formule générale IIIa :

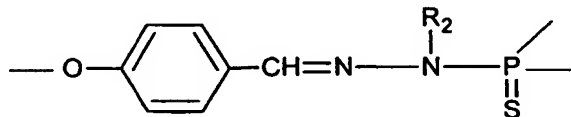


et le groupement de formule générale IIIb :



dans lequel R₅ représente un atome de soufre, d'oxygène ou d'azote.

4. Support selon la revendication 2 ou 3, caractérisé par le fait que les dendrimères sont choisis parmi les composés dans lesquels le groupe de formule (I) représente le groupe suivant :



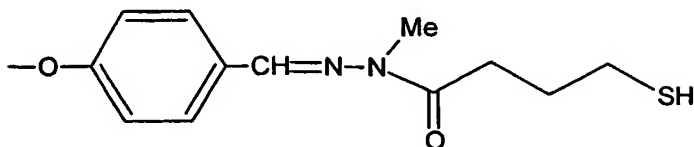
5

dans lequel R₂ représente un radical alkyle en C₁-C₁₂ et plus particulièrement un radical méthyle ;

et le groupe de formule (II) représente l'un des deux groupes suivants :



ou



10

et dans lesquels le nombre de générations varie de préférence entre 1 et 6.

15

5. Support solide selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé par le fait qu'il est choisi parmi les supports comportant au moins une surface siliciée telle que les lames, les billes et les capillaires en verre, les supports en silicium, en plastique et les supports métalliques.

20

6. Procédé de préparation d'un support solide tel que défini à l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisé par le fait qu'il comprend une étape de formation d'une liaison covalente entre des dendrimères phosphorés possédant un noyau central qui contient au moins deux groupements fonctionnels, lesdits dendrimères comportant à leur périphérie plusieurs fonctions aptes à permettre leur fixation sur ladite surface et la fixation ou la synthèse *in situ* de molécules d'intérêt, et la surface fonctionnalisée ou non d'un support solide pour obtenir un support solide fonctionnalisé de façon covalente par lesdits dendrimères.

25

7. Procédé selon la revendication 6, caractérisé par le fait que les dendrimères comportent à leur périphérie des fonctions permettant l'accrochage direct

par l'intermédiaire d'une liaison covalente de ces derniers sur la surface non préalablement fonctionnalisée dudit support solide.

8. Procédé selon la revendication 7, caractérisé par le fait que les dendrimères comportent à leur périphérie des fonctions thiol et que le support solide
5 comprend une surface d'or.

9. Procédé selon la revendication 6, dans lequel la surface du support solide utilisé ne comprend pas de fonctions compatibles avec les fonctions périphériques du dendrimère utilisé, caractérisé par le fait qu'il comprend les étapes suivantes :

10 a) la fonctionnalisation d'au moins une surface d'un support solide par des fonctions aptes à permettre la fixation de dendrimères phosphorés possédant un noyau central qui contient au moins deux groupements fonctionnels, lesdits dendrimères comportant à leur périphérie plusieurs fonctions aptes à permettre leur fixation sur ladite surface ainsi fonctionnalisée et la fixation ou la synthèse *in situ* de
15 molécules d'intérêt ;

b) la préactivation éventuelle des fonctions du support pour obtenir une surface fonctionnalisée activée,

c) la formation d'une liaison covalente entre lesdits dendrimères et ladite surface fonctionnalisée et éventuellement activée, pour obtenir un support solide
20 fonctionnalisé de façon covalente par lesdits dendrimères.

10. Procédé selon la revendication 9, caractérisé par le fait que l'étape a) de fonctionnalisation de la surface du support solide est réalisée par silanisation au moyen d'un réactif de silanisation comportant des fonctions aptes à fixer les dendrimères, telles que par exemple des groupements amine.

25 11. Procédé selon la revendication 9 ou 10, caractérisé par le fait que le réactif de silanisation est aminé.

12. Procédé selon l'une quelconque des revendications 9 à 11, caractérisé par le fait que l'étape de préactivation est réalisée par traitement du support à l'aide d'un agent alcalinisant, pendant une durée comprise entre 2 et 20 minutes.

30 13. Procédé selon l'une quelconque des revendications 6 à 12, caractérisé par le fait que l'étape de fixation covalente des dendrimères, consiste à :

- préparer une solution desdits dendrimères dans un solvant,

- mettre ladite solution de dendrimères en contact avec la surface éventuellement fonctionnalisée et éventuellement activée, pendant une durée comprise entre 10 minutes et 24 heures.

5 14. Procédé selon l'une quelconque des revendications 6 à 13, caractérisé par le fait qu'à l'issue de l'étape de fixation covalente des dendrimères, les supports sont rincés puis séchés.

15 15. Utilisation d'un support solide fonctionnalisé par des dendrimères phosphorés tel que défini à l'une quelconque des revendications 1 à 5, comme support pour l'immobilisation et/ou la synthèse *in situ* de molécules d'intérêt.

10 16. Utilisation selon la revendication 15, caractérisée par le fait que les molécules d'intérêt sont des molécules d'acide nucléique, des lipides, des protéines ou leurs partenaires moléculaires.

15 17. Biopuce ou dendripuce caractérisée par le fait qu'elle est constituée d'un support solide comportant au moins une surface fonctionnalisée par des dendrimères phosphorés et tels que définis à l'une quelconque des revendications 1 à 5, sur lesquels sont fixées, de façon covalente, des molécules d'intérêt.

18. Biopuce selon la revendication 17, caractérisée par le fait qu'elle est réutilisable.

20 19. Procédé de préparation d'une biopuce telle que définie à la revendication 17 ou 18, caractérisé par le fait qu'il consiste à mettre en contact un support solide ayant au moins une surface fonctionnalisée par des dendrimères phosphorés et comportant à leur périphérie des fonctions aptes à permettre la fixation covalente de molécules d'intérêt avec une solution tampon renfermant des molécules d'intérêt préalablement fonctionnalisées par, ou comportant déjà, un ou plusieurs
25 groupements aptes à former une liaison covalente avec lesdites fonctions périphériques des dendrimères.

30 20. Procédé selon la revendication 19, caractérisé par le fait que les fonctions périphériques des dendrimères utilisés sont des fonctions aldéhydes, et que les molécules d'intérêt sont préalablement fonctionnalisées par, ou contiennent déjà, une ou plusieurs fonctions amine, ou sont préalablement fonctionnalisées par une ou plusieurs fonctions oxyamine (-ONH₂) ou hydrazine (-NH-NH₂).

21. Procédé selon la revendication 20, caractérisé par le fait que les molécules d'intérêt sont préalablement fonctionnalisées par, ou contiennent déjà, une ou plusieurs fonctions amine et que l'étape de fixation des molécules d'intérêt est suivie d'une étape de réduction des fonctions imines.

5 22. Procédé selon la revendication 19, caractérisé par le fait que les fonctions périphériques des dendrimères utilisés sont des fonctions thiol, et que les molécules d'intérêt sont préalablement fonctionnalisées par, ou contiennent déjà, une ou plusieurs fonctions thiol ou sont préalablement fonctionnalisées par une ou plusieurs fonctions iodoacétamido (-NHCO-CH₂-I).

10 23. Procédé selon la revendication 19, caractérisé par le fait que les fonctions périphériques des dendrimères utilisés sont des fonctions amines, et que les molécules d'intérêt sont préalablement fonctionnalisées par, ou contiennent déjà, une ou plusieurs fonctions aldéhyde, α -oxoaldéhyde, -COOR, -NCS ou -NHS.

15 24. Procédé selon la revendication 19, caractérisé par le fait que les fonctions périphériques des dendrimères utilisés sont des fonctions époxyde, et que les molécules d'intérêt sont préalablement fonctionnalisées par, ou contiennent déjà, une ou plusieurs fonctions amine.

20 25. Procédé selon l'une quelconque des revendications 19 à 24, caractérisé par le fait que la réaction de fixation covalente des molécules d'intérêt sur les dendrilames est réalisée à une température comprise entre 4 et 50°C, pendant une durée comprise entre 2 et 24 heures.

26. Utilisation d'une dendripuce selon la revendication 17 ou 18 comme puces à ADN, à peptides, à polypeptides ou à protéines.

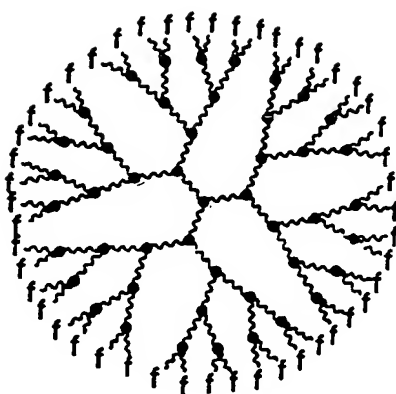


Figure 1

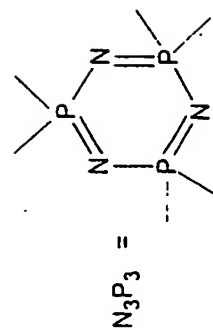
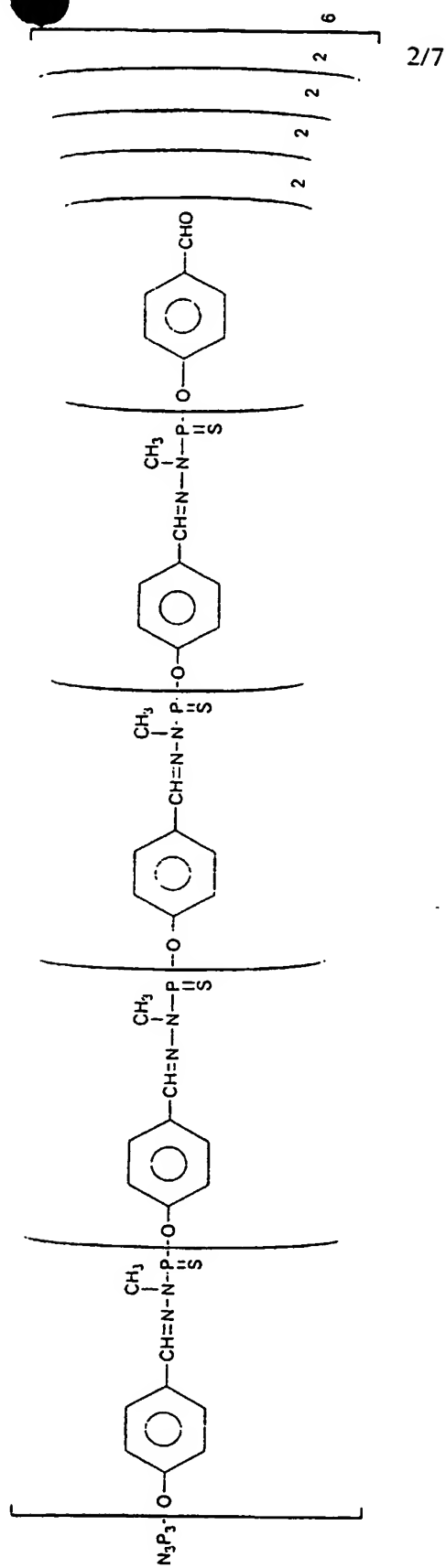


FIGURE 2

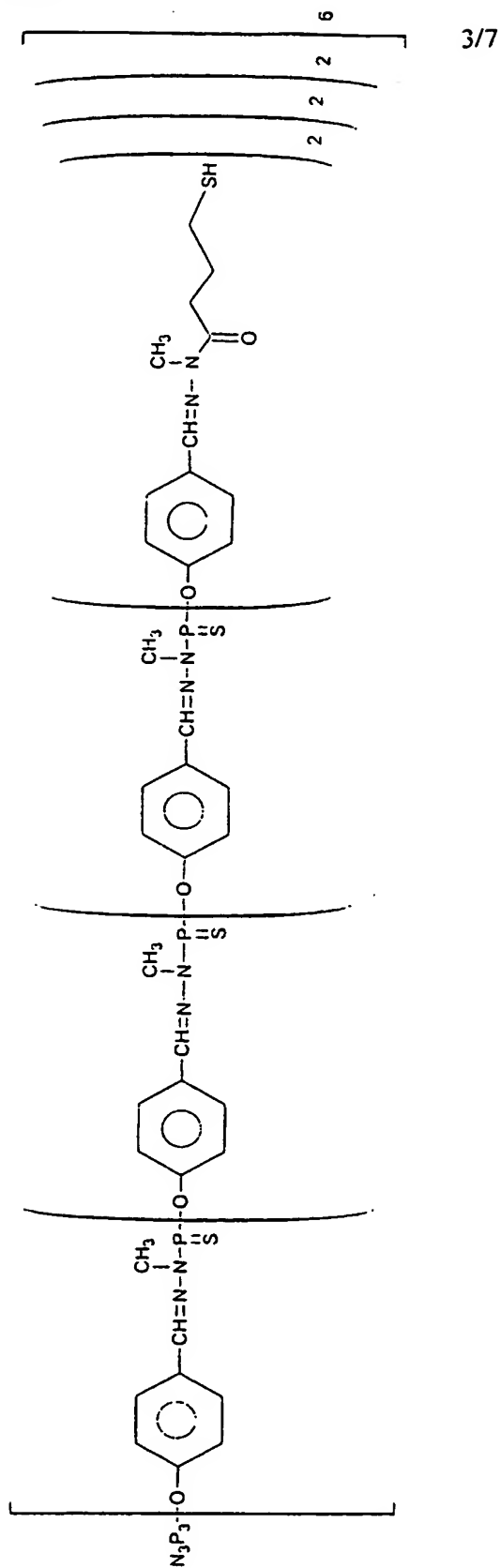
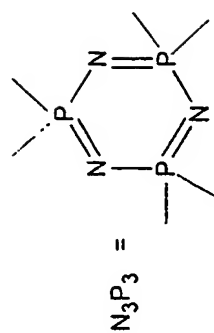


FIGURE 3



SCHEMA DE SYNTHESE A

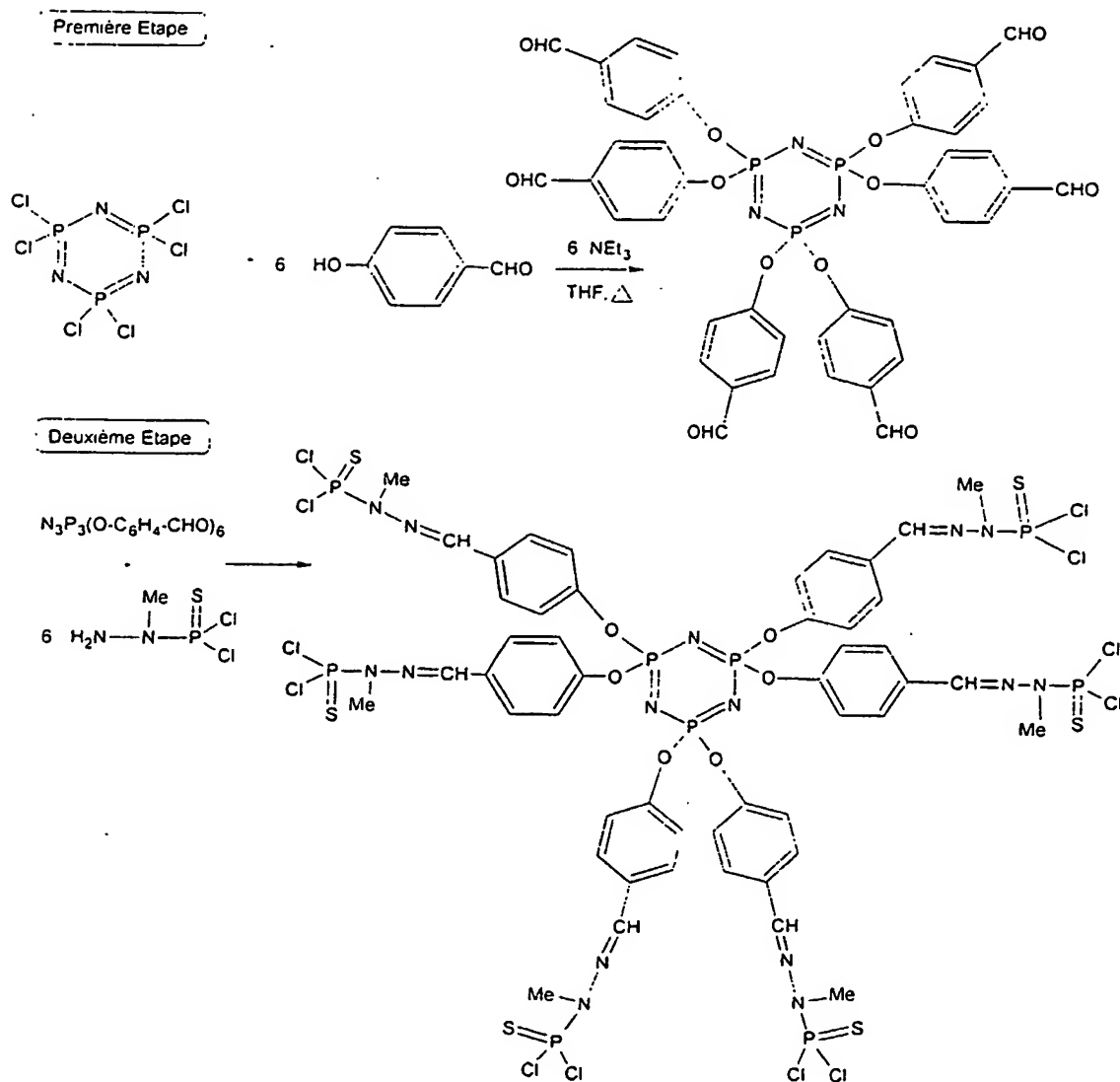


FIGURE 4

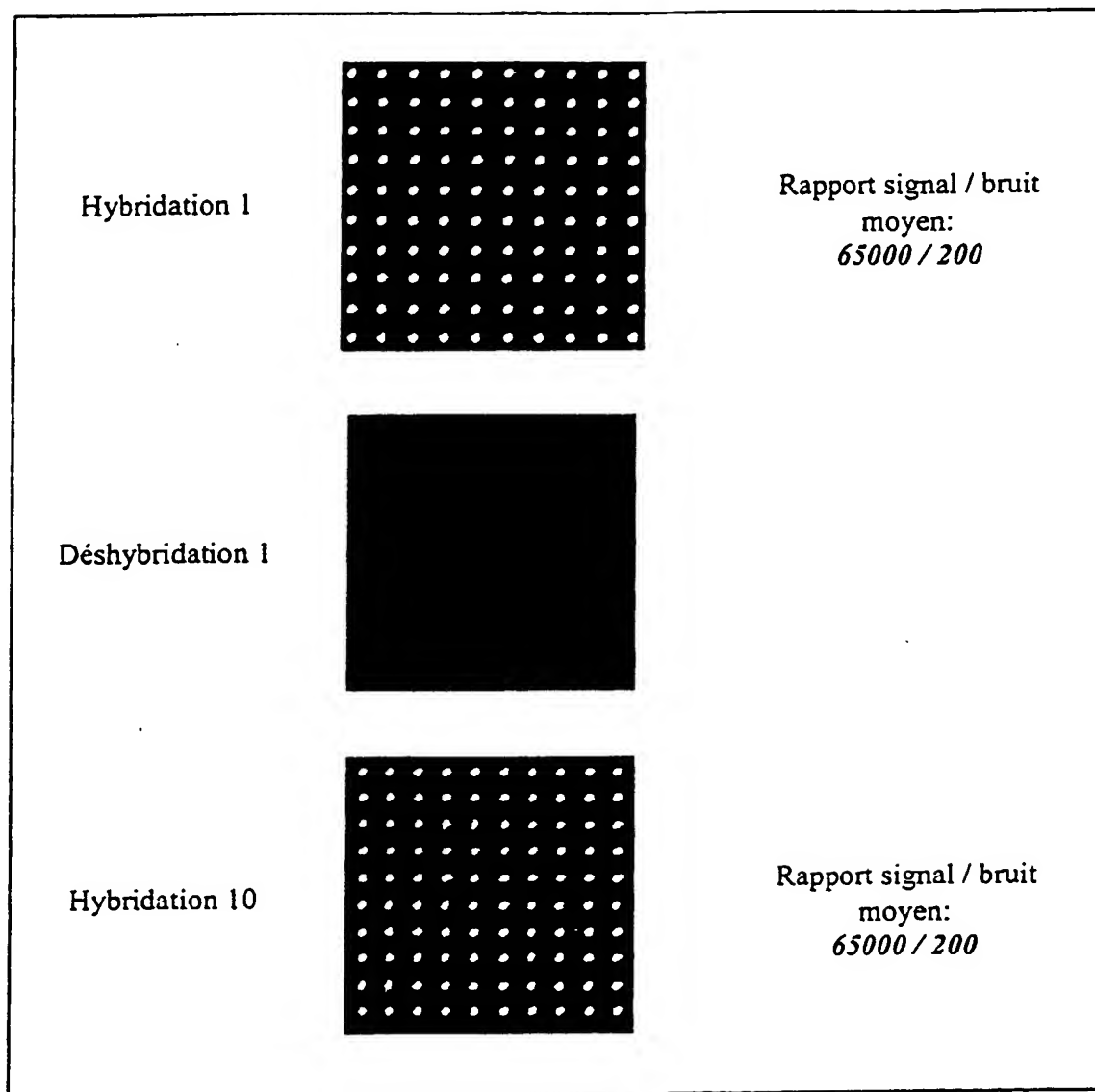


Figure 5

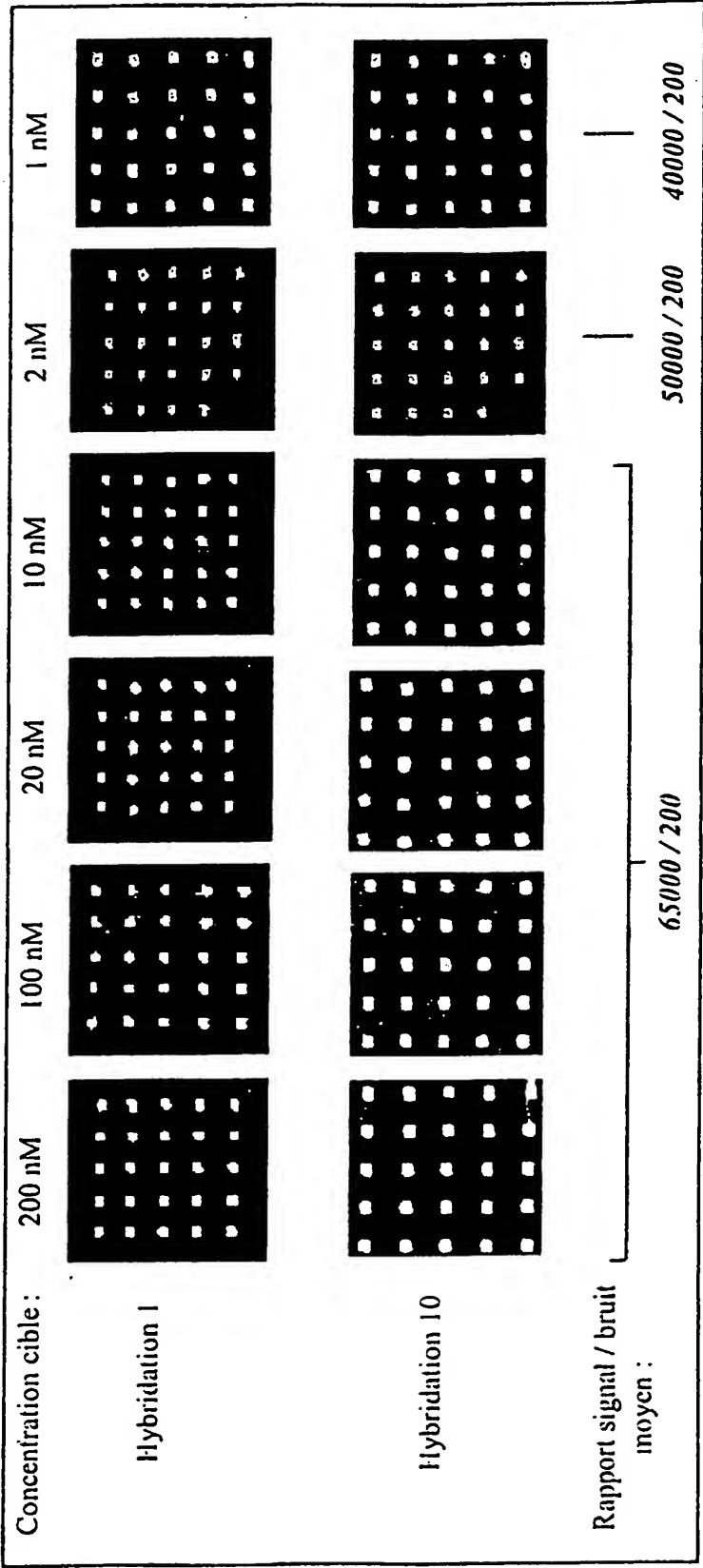


Figure 6

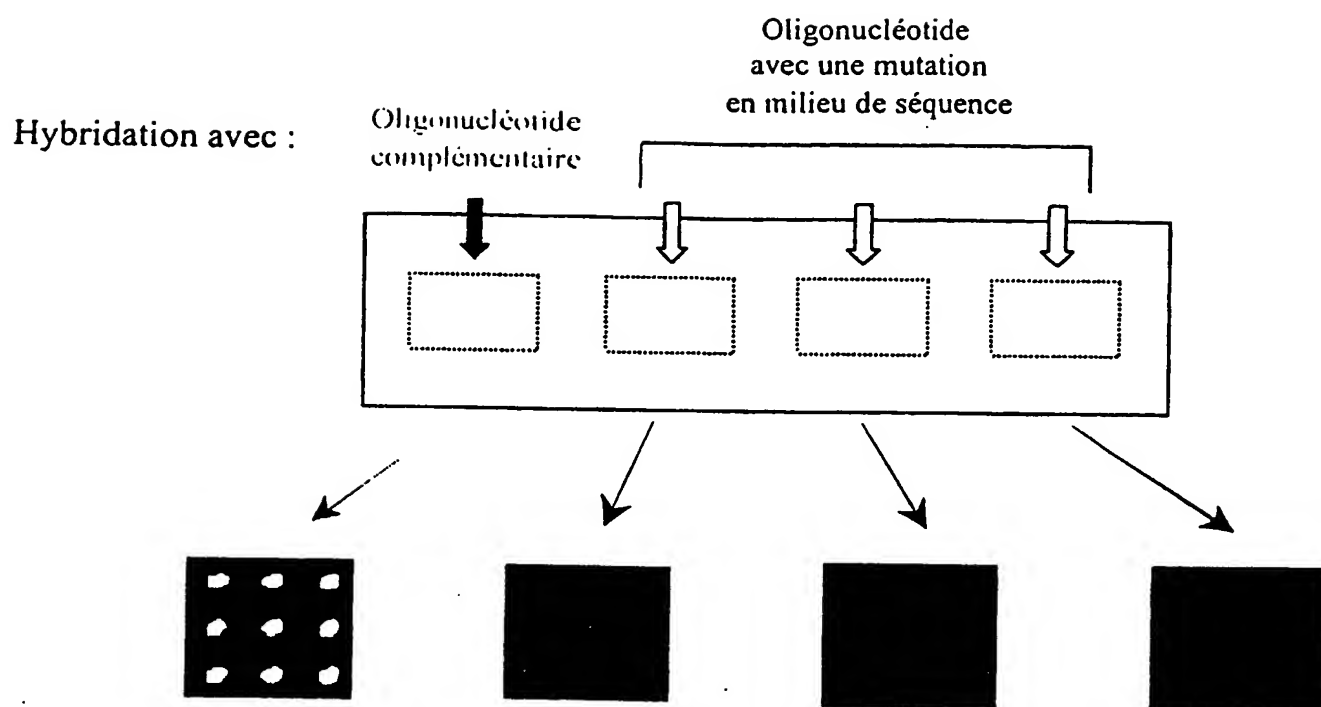


Figure 7

Rec'd PCT/PTO 22 OCT 2004

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
6 novembre 2003 (06.11.2003)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2003/091304 A3

(51) Classification Internationale des brevets⁷ :

C07F 9/6581, C07H 21/00, C07B 61/00

MEUNIER, Bernard [FR/FR]; 7 impasse des Meuniers,
F-31320 Castenet (FR).

(21) Numéro de la demande internationale :

PCT/FR2003/001231

(74) Mandataires : GOULARD, Sophie etc.; CABINET
ORES, 36 rue de Saint Petersburg, F-75008 Paris (FR).

(22) Date de dépôt international : 17 avril 2003 (17.04.2003)

(25) Langue de dépôt :

français

(26) Langue de publication :

français

(30) Données relatives à la priorité :

02/05049

23 avril 2002 (23.04.2002) FR

(81) États désignés (*national*) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ,
DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,
MZ, NI, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE,
SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,
VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(71) Déposants (*pour tous les États désignés sauf US*) :
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE [FR/FR]; 3 rue Michel Ange, F-75016 Paris (FR). INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE [FR/FR]; 147 rue de l'Université, F-75007 Paris (FR).

(84) États désignés (*régional*) : brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (*pour US seulement*) : TREVISIOL, Emmanuelle [FR/FR]; 16 Vieux Chemin de Blagnac, F-31700 Cornebarrieu (FR). LECLAIRE, Julien [FR/FR]; 15 ru Velane, F-31000 Toulouse (FR). PRATVIEL, Geneviève [FR/FR]; 8 chemin Savit, F-31100 Toulouse (FR). CAMINADE, Anne-Marie [FR/FR]; 17 rue de l'Esterel, F-31400 Toulouse (FR). FRANCOIS, Jean [FR/FR]; 3 place Albert Camus, F-31320 Castenet Tolosan (FR). MAJORAL, Jean-Pierre [FR/FR]; 11 allée Montcalm, F-31520 Ramonville (FR).

Publiée :

— avec rapport de recherche internationale

(88) Date de publication du rapport de recherche internationale:

15 avril 2004

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

(54) Title: SOLID SUPPORTS FUNCTIONALISED BY PHOSPHORUS DENDRIMERS, METHOD FOR PREPARING SAME AND USES THEREOF

(54) Titre : SUPPORTS SOLIDES FONCTIONNALISES PAR DES DENDRIMERES PHOSPHORES, LEUR PROCEDE DE PREPARATION ET APPLICATIONS

(57) Abstract: The invention concerns solid supports functionalised by phosphorus dendrimers, a method for preparing same and uses thereof for preparing biochips and the uses of said biochips, in particular for immobilizing molecules of interest, particularly biological molecules of interest such as nucleic acids, polypeptides, lipids and proteins.

(57) Abrégé : La présente invention est relative à des supports solides fonctionnalisés par des dendrimères phosphorés, à leur procédé de préparation, à leur utilisation pour la préparation de biopuces et aux applications de ces biopuces, en particulier pour l'immobilisation de molécules d'intérêt, notamment de molécules biologiques d'intérêt telles que des acides nucléiques, des polypeptides, des lipides et des protéines.

WO 2003/091304 A3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/FR 03/01231

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C07F9/6581 C07H21/00 C07B61/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C07F C07H C07B

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>TURRIN CEDRIC-OLIVIER ET AL: "Organic-Inorganic Hybrid Materials Incorporating Phosphorus-Containing Dendrimers" CHEMISTRY OF MATERIALS, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, WASHINGTON, US, vol. 12, no. 12, 2000, pages 3848-3856, XP002213478 ISSN: 0897-4756 page 3848, left-hand column, paragraph 1 -page 3849 * schéma 1 * * page 3856, conclusion *</p> <p style="text-align: center;">--- -/--</p>	1-7,9-16

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *Z* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

23 October 2003

Date of mailing of the international search report

30/10/2003

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Held, P

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/FR 03/01231

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>SOLER-ILLIA ET AL.: "New mesotextured hybrid materials made from assemblies of dendrimers and titanium (IV)-oxo-organo clusters"</p> <p>ANGEW. CHEM. INT. ED., vol. 39, no. 23, 2000, pages 4250-4254, XP002228108</p> <p>page 4250, left-hand column, paragraph 1</p> <p>page 4251, left-hand column, line 19 - line 21</p> <p>page 4252, right-hand column, last paragraph</p> <p>* schéma 2 *</p>	1-7,9, 13,14
X	<p>MARAVAL ET AL: "Varying topology of dendrimers - a new approach toward the synthesis of di-block dendrimers"</p> <p>EUR. J. INORG. CHEM., 2001, pages 1681-1691, XP002228109</p> <p>figure 1</p> <p>page 1685, left-hand column, paragraph 1</p>	1,2
Y	<p>BENTERS R. ET AL.: "Dendrimer-activated solid supports for nucleic acid and protein microarrays"</p> <p>CHEMBIOCHEM, vol. 2, 2001, pages 686-694, XP002228110</p> <p>cited in the application</p> <p>page 686 -page 688</p> <p>* schéma 1 *</p>	1-7, 9-19,25, 26
Y	<p>FR 2 801 592 A (CENTRE NAT RECH SCIENT)</p> <p>1 June 2001 (2001-06-01)</p> <p>claims</p> <p>figures 1,2</p>	1-3,5-7, 9-19,25, 26
Y	<p>MARAVAL V: "Rapid synthesis of phosphorus-containing dendrimers with controlled molecular architectures: first example of surface-block, layer-block, and segment-block dendrimers issued from the same dendron"</p> <p>JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, WASHINGTON, DC, US, vol. 122, no. 11, 22 March 2000 (2000-03-22), pages 2499-2511, XP002144561</p> <p>ISSN: 0002-7863</p> <p>* schéma 5 *</p>	4

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/FR 03/01231

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	GALLIOT C ET AL: "REGIOSELECTIVE STEPWISE GROWTH OF DENDRIMER UNITS IN THE INTERNAL VOIDS OF A MAIN DENDRIMER" SCIENCE, AMERICAN ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF SCIENCE,, US, vol. 277, 26 September 1997 (1997-09-26), pages 1981-1984, XP000929654 ISSN: 0036-8075 page 1981 figure 1	3
A	WO 01 51689 A (WANG DAGUANG ;SCHWEITZER MARKUS (DE); WINDHAB NORBERT (DE); HAVENS) 19 July 2001 (2001-07-19) cited in the application claim 1 figures	1,6,15, 17,19,26
A	WO 00 55627 A (EOS BIOTECHNOLOGY INC ;HA KIM (US); SAMAHA RAYMOND (US); HEYNEKER) 21 September 2000 (2000-09-21) cited in the application claim 1	18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

on patent family members

PCT/FR 03/01231

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
FR 2801592	A	01-06-2001	FR 2801592 A1	01-06-2001
			AT 239749 T	15-05-2003
			CA 2392697 A1	31-05-2001
			DE 60002603 D1	12-06-2003
			EP 1232165 A1	21-08-2002
			WO 0138335 A1	31-05-2001
			JP 2003514912 T	22-04-2003
<hr/>				
WO 0151689	A	19-07-2001	AU 6769700 A	24-07-2001
			CA 2397091 A1	19-07-2001
			EP 1257695 A1	20-11-2002
			JP 2003521680 T	15-07-2003
			WO 0151689 A1	19-07-2001
<hr/>				
WO 0055627	A	21-09-2000	AU 3750000 A	04-10-2000
			WO 0055627 A1	21-09-2000
<hr/>				

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

PCT/FR 03/01231

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 7 C07F9/6581 C07H21/00 C07B61/00

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
CIB 7 C07F C07H C07B

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)
EPO-Internal, WPI Data, PAJ, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	<p>TURRIN CEDRIC-OLIVIER ET AL: "Organic-Inorganic Hybrid Materials Incorporating Phosphorus-Containing Dendrimers" CHEMISTRY OF MATERIALS, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, WASHINGTON, US, vol. 12, no. 12, 2000, pages 3848-3856, XP002213478 ISSN: 0897-4756 page 3848, colonne de gauche, alinéa 1 -page 3849 * schéma 1 * * page 3856, conclusion *</p> <p style="text-align: center;">--- -/--</p>	1-7, 9-16



Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents



Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- *T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- *X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- *Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- *S* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

23 octobre 2003

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

30/10/2003

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Held, P

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	<p>SOLER-ILLIA ET AL.: "New mesotextured hybrid materials made from assemblies of dendrimers and titanium (IV)-oxo-organo clusters"</p> <p>ANGEW. CHEM. INT. ED., vol. 39, no. 23, 2000, pages 4250-4254, XP002228108 page 4250, colonne de gauche, alinéa 1 page 4251, colonne de gauche, ligne 19 - ligne 21 page 4252, colonne de droite, dernier alinéa * schéma 2 *</p>	1-7, 9, 13, 14
X	<p>MARAVAL ET AL: "Varying topology of dendrimers - a new approach toward the synthesis of di-block dendrimers"</p> <p>EUR. J. INORG. CHEM., 2001, pages 1681-1691, XP002228109 figure 1 page 1685, colonne de gauche, alinéa 1</p>	1, 2
Y	<p>BENTERS R. ET AL.: "Dendrimer-activated solid supports for nucleic acid and protein microarrays"</p> <p>CHEMBIOCHEM, vol. 2, 2001, pages 686-694, XP002228110 cité dans la demande page 686 -page 688 * schéma 1 *</p>	1-7, 9-19, 25, 26
Y	<p>FR 2 801 592 A (CENTRE NAT RECH SCIENT) 1 juin 2001 (2001-06-01)</p> <p>revendications figures 1, 2</p>	1-3, 5-7, 9-19, 25, 26
Y	<p>MARAVAL V: "Rapid synthesis of phosphorus-containing dendrimers with controlled molecular architectures: first example of surface-block, layer-block, and segment-block dendrimers issued from the same dendron"</p> <p>JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, WASHINGTON, DC, US, vol. 122, no. 11, 22 mars 2000 (2000-03-22), pages 2499-2511, XP002144561 ISSN: 0002-7863 * schéma 5 *</p>	4

-/--

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	GALLIOT C ET AL: "REGIOSELECTIVE STEPWISE GROWTH OF DENDRIMER UNITS IN THE INTERNAL VOIDS OF A MAIN DENDRIMER" SCIENCE, AMERICAN ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF SCIENCE,, US, vol. 277, 26 septembre 1997 (1997-09-26), pages 1981-1984, XP000929654 ISSN: 0036-8075 page 1981 figure 1	3
A	WO 01 51689 A (WANG DAGUANG ;SCHWEITZER MARKUS (DE); WINDHAB NORBERT (DE); HAVENS) 19 juillet 2001 (2001-07-19) cité dans la demande revendication 1 figures	1, 6, 15, 17, 19, 26
A	WO 00 55627 A (EOS BIOTECHNOLOGY INC ;HA KIM (US); SAMAHA RAYMOND (US); HEYNEKER) 21 septembre 2000 (2000-09-21) cité dans la demande revendication 1	18

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs

de familles de brevets

PCT/FR 03/01231

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
FR 2801592	A	01-06-2001	FR 2801592 A1	01-06-2001
			AT 239749 T	15-05-2003
			CA 2392697 A1	31-05-2001
			DE 60002603 D1	12-06-2003
			EP 1232165 A1	21-08-2002
			WO 0138335 A1	31-05-2001
			JP 2003514912 T	22-04-2003
WO 0151689	A	19-07-2001	AU 6769700 A	24-07-2001
			CA 2397091 A1	19-07-2001
			EP 1257695 A1	20-11-2002
			JP 2003521680 T	15-07-2003
			WO 0151689 A1	19-07-2001
WO 0055627	A	21-09-2000	AU 3750000 A	04-10-2000
			WO 0055627 A1	21-09-2000

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☒ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.